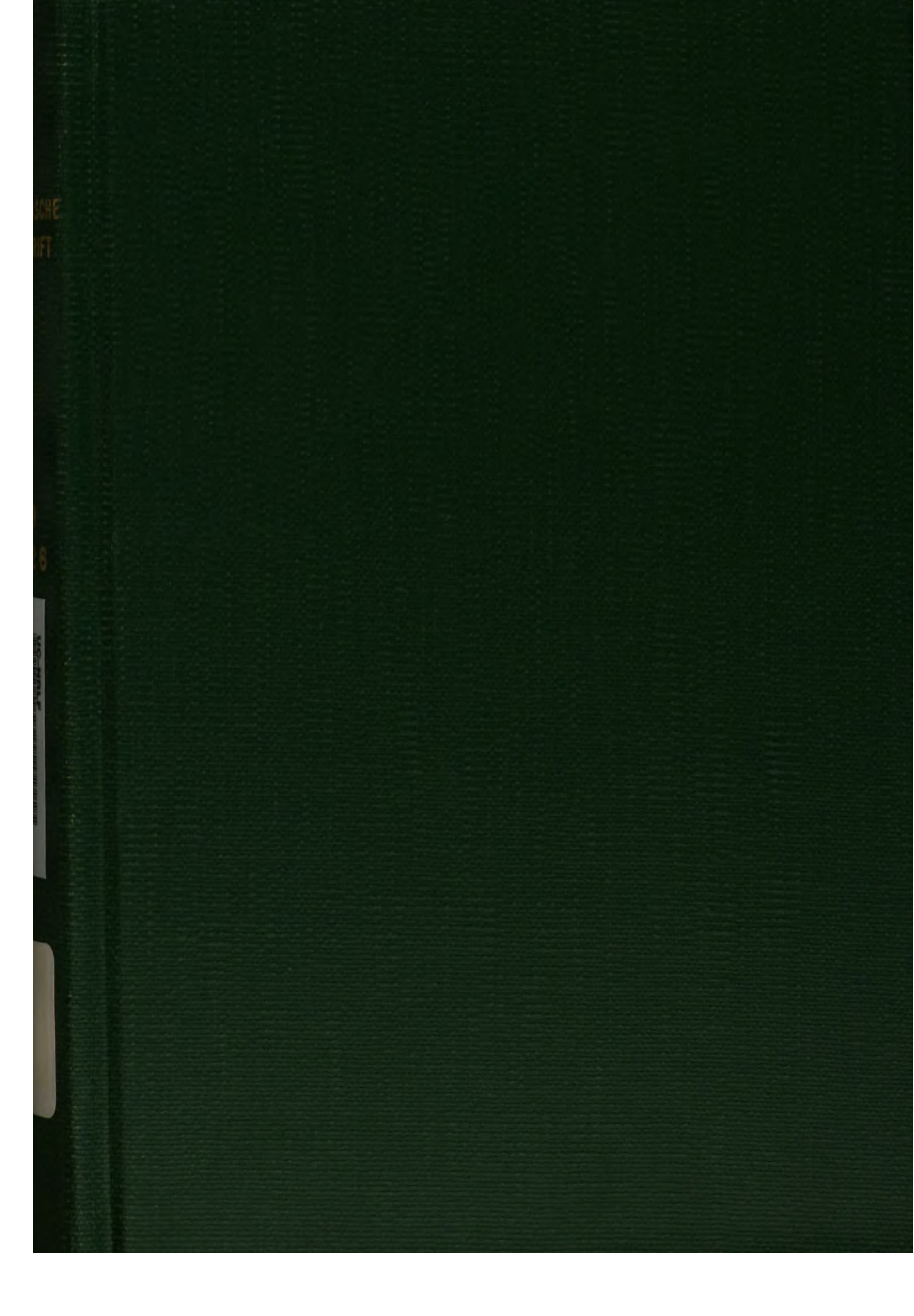
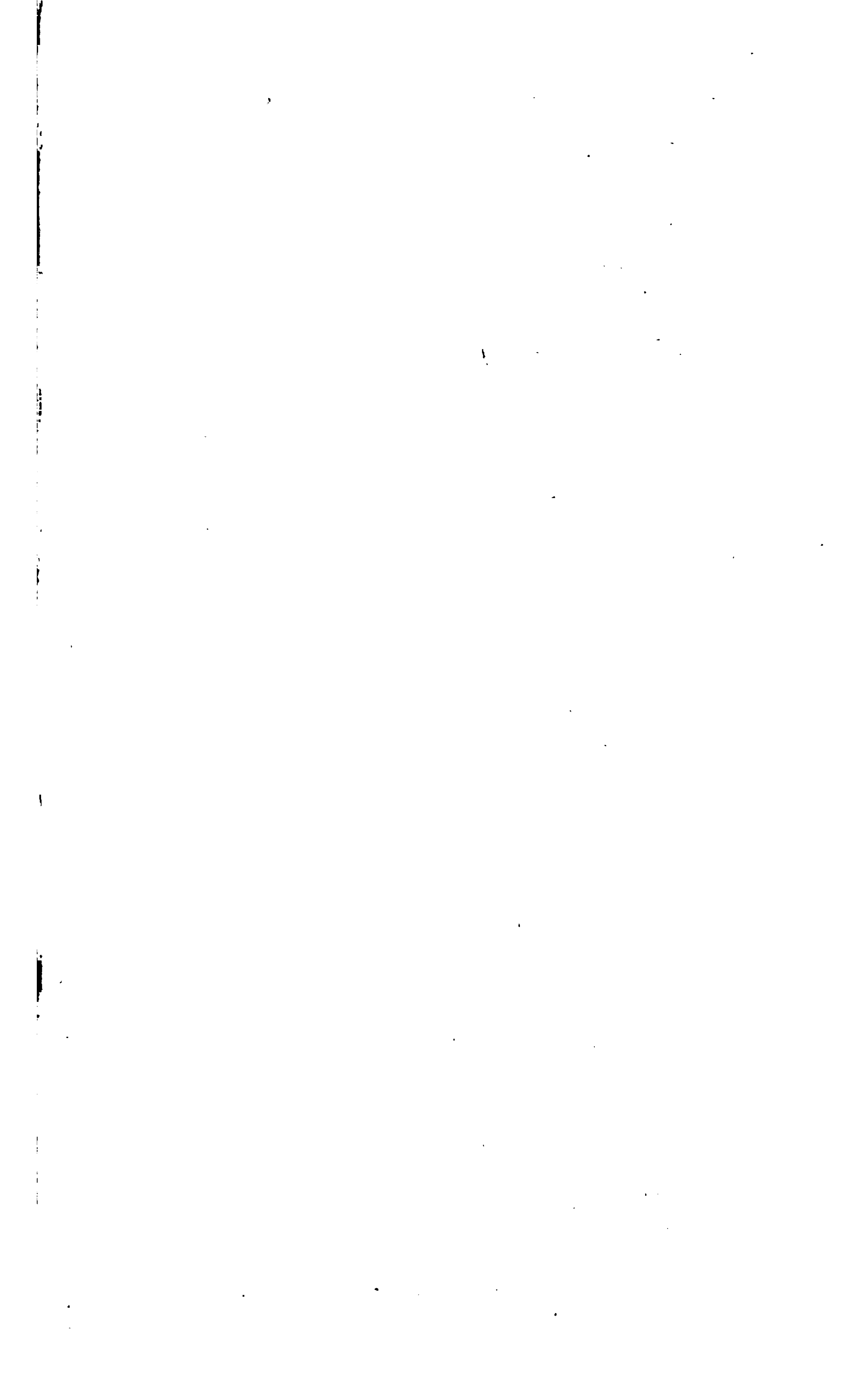
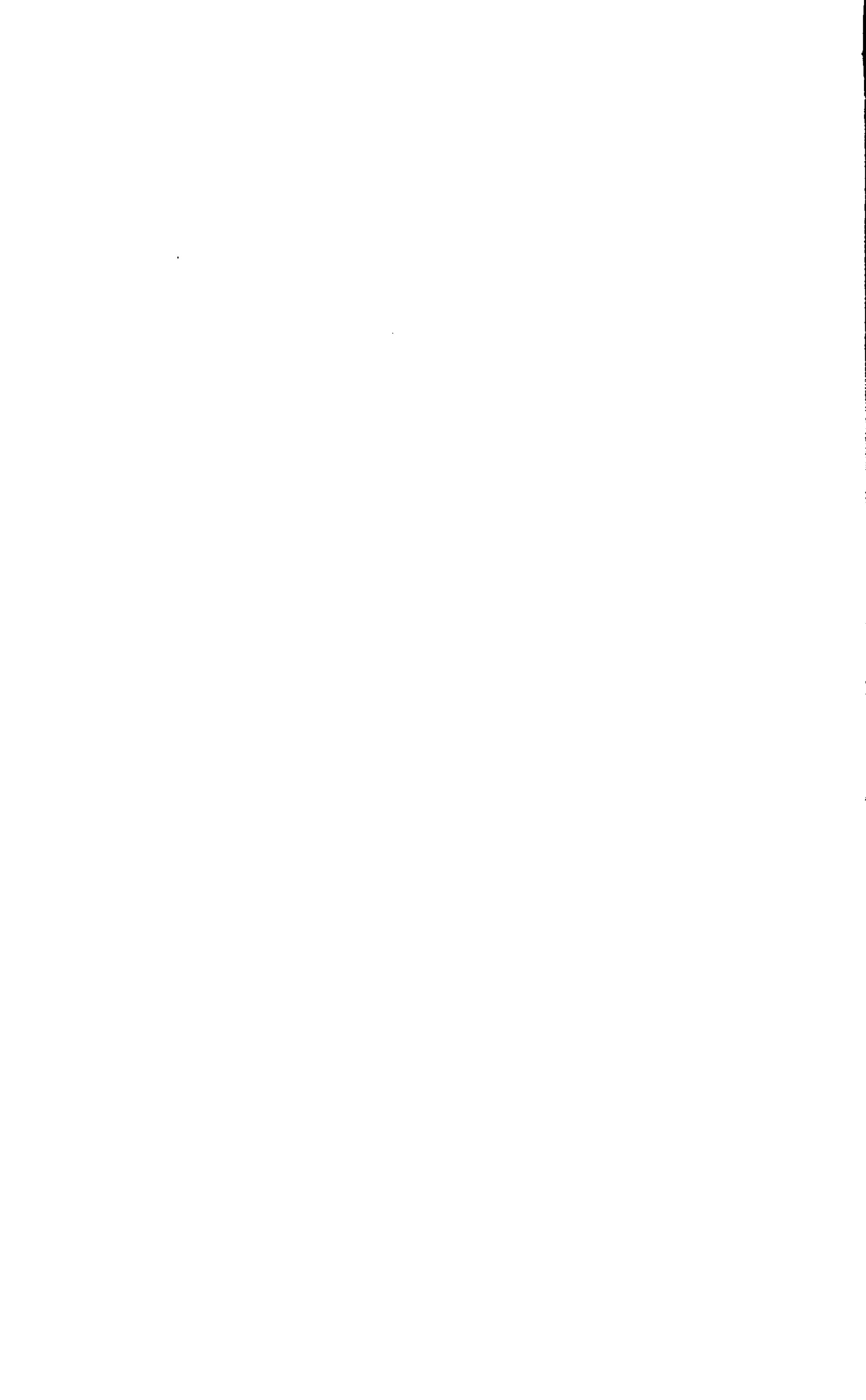










Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau.

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertneunundsiebzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

L. v. Liebermann †.

Vor kurzem schied in Budapest aus einem langen und gesegneten Gelehrtenleben *Leo v. Liebermann.*

Er war im Jahre 1852 in Debreczen als Sohn eines bekannten Arztes geboren und studierte in Wien ursprünglich mit der Absicht, Chirurg zu werden. Frühzeitig erwachte jedoch sein Interesse für chemische Probleme, und er widmete sich diesem Wissenszweige mit solchem Erfolg, daß ihm bereits als Student eine Assistentenstelle am medizinisch-chemischen Institut zu Innsbruck übertragen wurde. Hier habilitierte er sich im Jahre 1875, um im Jahre 1879 als Professor der Chemie an die Tierärztliche Hochschule in Budapest überzusiedeln. 1881 übernahm er dann die Leitung des chemischen Landesuntersuchungsamts und organisierte in großzügiger Weise die ungarische Nahrungsmittelhygiene. Nach 21 jähriger Tätigkeit auf diesem Posten folgte er im Jahre 1902 der Berufung auf den Lehrstuhl der Hygiene an der medizinischen Fakultät der Budapester Universität, den er noch 24 Jahre innegehabt hat.

Außer dem Gebiete der Nahrungsmittelchemie hat *v. Liebermann* verschiedene Teile der allgemeinen Hygiene

und Immunitätslehre namentlich in biologischer Hinsicht wesentlich gefördert. Veröffentlichungen über die Nucleine, über embryochemische Fragen, Beiträge zur Theorie der wässerigen Lösung von Salzgemischen, methodische Untersuchungen über die Fettbestimmung und über die Bedingungen für die Entflammbarkeit des Petroleums, die Bereitung eines künstlichen Komplements (bestehend aus Natriumoleat, Chlorcalcium sowie inaktiviertem Normalserum) und Aufstellung einer Hypothese zur Erklärung der Immunitätserscheinungen (Selektionstheorie) geben Zeugnis von der bedeutenden Vielseitigkeit des heimgegangenen Gelehrten, der ebenso groß als Mensch wie als Forscher gewesen ist.

C. N.

Beitrag zur Kenntnis eines Sexualhormons der menschlichen Placenta (Feminin).

Von

E. Glimm und **F. Wadehn.**

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule zu Danzig.)

(Eingegangen am 20. September 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Unsere Kenntnisse über das aus der Follikelflüssigkeit zu gewinnende Hormon sind in der letzten Zeit wesentlich gefördert worden. Wir haben uns mit der Isolierung des aus der Placenta zu erhaltenden Hormons, das mit dem genannten wahrscheinlich identisch ist, befaßt und wollen im folgenden einen Weg beschreiben, auf dem es gelingt, aus der menschlichen Placenta Extrakte zu erhalten, die am Versuchstier hochwirksam sind.

Laqueur hat kürzlich für Zubereitungen des Hormons des östrischen Zyklus (Feminin), die mindestens 10 Mäusebrunsteinheiten (M.-E.) in 1 mg Substanz enthalten, die Bezeichnung *Menformon* eingeführt. *Fellner*, der erste erfolgreiche Arbeiter auf dem Gebiet des weiblichen Sexualhormons, nannte diesen Stoff *Feminin*. *Laqueurs* Definition hat den Nachteil, daß alle Zubereitungen, die nicht ganz die vorgeschriebene Wirksamkeit entfalten, nicht unter diese Bezeichnung fallen und daß für das Hormon selbst wieder eine andere Benennung notwendig ist. Wir haben den von *Fellner* vorgeschlagenen, recht treffenden Namen angenommen und führen bei den einzelnen Versuchen stets die Wirksamkeit der angewandten Substanz in Mäuseeinheiten ausgedrückt an.

Der eine von uns (*Wadehn*) hat kürzlich an anderer Stelle[1]) einen Überblick über die Entwicklung unserer Kenntnisse über Sexualhormone gegeben. Wir wollen daher hier auf die Geschichte der Sexualhormonforschung nicht näher eingehen und geben im folgenden nur einen kurzen Überblick über die zuletzt erschienenen Arbeiten.

Mit besonderem Erfolge haben sich *Laqueur, Hart, de Jongh* und *Wijsenbeek*[2]) um die Gewinnung des Hormons aus dem Follikelsaft bemüht. Es gelang ihnen, das Menformon so weit zu reinigen, daß die besten Präparate

[1]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1926, S. 468.

[2]) *Laqueur* und Mitarbeiter, Deutsch. med. Wochenschr. 1926, S. 4 und 52.

nur noch 0,01 bis 0,001 mg Trockensubstanz auf 1 M.-E. enthielten. *Zondek*[1]) konnte allerdings diese Ergebnisse nicht reproduzieren; seine von ihm nach *Laqueur* dargestellten Zubereitungen fand er sogar gänzlich hormonfrei. Das von *Zondek* dargestellte „Follikulin A“ enthält 15 mg Trockensubstanz auf 1 M.-E. *Zondeks* „Follikulin B“ hat nach der in der genannten Arbeit angeführten Tabelle eine Reinheit von 0,05 mg auf 1 M.-E. Leider sind die Angaben in dieser Tabelle durch Druckfehler entstellt. Der Aschengehalt für „Follikulin B“ beträgt nach ihr 0,06 mg und der Stickstoff 0,2 mg für 1 M.-E. Nach einer neuesten Mitteilung (Klin. Wochenschr. 1926, S. 1521) konnte *Zondek* jetzt die *Laqueur*schen Befunde im wesentlichen bestätigen. Er gibt den Trockengehalt seines „Follikulin B“ auf 0,5 mg an. Unser bestes aus der *Placenta* hergestelltes Präparat hat eine Wirksamkeit von 0,1 bis 0,2 mg Trockensubstanz auf 1 M.-E. Über die chemische Natur des Hormons sind die Ansichten geteilt: *Fellner, Herrmann, Faust* und auch *Allen* und *Doisy* halten es für einen lipoidartigen wasserunlöslichen Körper. *Zondek* und *Aschheim* haben als erste das Hormon in wässeriger Lösung erhalten, *Loewe* und besonders *Laqueur* bestätigen diese Angaben. Unsere eigenen Ansichten werden wir weiter unten entwickeln.

Methodik.

Uterusmethode. Die älteren Untersucher bedienten sich der wachstumssteigernden Wirkung auf den Uterus des weiblichen Kaninchens als Kriterium für die Beurteilung ihrer hormonhaltigen Substanzen. Wir haben diese Methode anfänglich ausschließlich und nach Einführung der Abstrichmethode als Kontrolle benutzt. Wir sind zu der Überzeugung gelangt, daß sie für qualitative Zwecke sehr brauchbar ist und ganz eindeutige Ausschläge liefert.

Zondek und *Laqueur* und die amerikanischen Autoren bezweifeln ihre Brauchbarkeit auf das lebhafteste. Wir glauben aber, daß bei Verwendung junger, etwa 3 bis 4 Wochen alter Tiere ein Irrtum über den positiven oder negativen Ausfall eines Versuchs ebensowenig möglich ist, wie bei der Abstrichmethode. Weibliche Kaninchen dieses Alters wiegen etwa 400 bis 600 g und haben noch einen kleinen fadendünnen, ganz blassen Uterus. Brunsterscheinungen, die periodisch den Uterus zum Schwellen bringen und daher Anlaß zu Irrtümern geben könnten, treten bei so jungen Tieren noch nicht auf.

Wir gingen bei unseren Versuchen so vor, daß wir am ersten und dritten Tage je die Hälfte des zu prüfenden Extraktes dem Versuchstier unter die Rückenhaut spritzten und es am siebenten Tage töteten. Wir verwandten zur Injektion Emulsionen in sehr verdünntem Ammoniak oder Lösungen in Olivenöl.

Der Uterus ist bei positivem Versuchsausfall bedeutend in Länge und Dicke gewachsen, tiefrot, strotzend von Blut. Zur Abschätzung der Wirkung der injizierten Substanzen benutzten wir die Gewichte der Uteri. Der Uterus mit Tuben und Ovarien wurde sofort nach dem Tode des Tieres herausgeschnitten, sauber von allen anhängenden Fasern befreit und gewogen. Das Gewicht der Uteri von drei- bis vier-

[1]) *Zondek*, Klin. Wochenschr. 1926, S. 1220.

wöchigen Kaninchen schwankt allerdings nicht unerheblich, beträgt aber selten über 0,1 g und liegt gewöhnlich bei 0,05 g. Nach wirksamen Dosen treten Gewichtssteigerungen auf, die das Vielfache des Maximalgewichts des normalen Uterus betragen. In einem Falle wogen wir einen Uterus von 2,03 g.

Die absolute Empfindlichkeit der Kaninchenmethode ist natürlich geringer als die der gleich zu besprechenden Abstrichmethode; immerhin dürften 10 bis 20 M.-E. einen keinesfalls zu übersehenden Effekt am Uterus hervorrufen. Wir bringen im folgenden die Zahlen einer Versuchsreihe, wie wir sie an Tieren gleichen Wurfes durch Injektion steigender Extraktmengen erhalten haben. Die Wirksamkeit betrug 4 bis 8 mg Trockensubstanz für 1 M.-E. (abgekürzt: $W = 4$ bis 8 mg/M.-E.).

Es erhielten Tier 52 (Gewicht 370 g) 0,05 g Extrakt; Tier 53 (Gewicht 390 g) 0,10 g; Tier 54 (Gewicht 460 g) 0,20 g; Tier 55 (Gewicht 340 g) 0,40 g. Das Vergleichstier wog 430 g. Die Substanz wurde den Tieren am 26. und 28. Juli je zur Hälfte eingespritzt. Bei der Tötung am 1. August wogen die Uteri: Vergleich 0,06 g; Tier 52 0,17 g; Tier 53 0,24 g; Tier 54 0,51 g; Tier 55 0,98 g.



1 2 3 4 5 6

Abb. 1. Kaninchenuteri.
5 Vergleichstier. 4 bis 1 erhielten 0,05 bis 0,40 g Rohextrakt. 6 erhielt 0,005 g Reinextrakt.

In Abb. 1 geben wir die Photographien der Uteri wieder. 6 bis 12 M.-E. brachten also in diesem Falle eine Steigerung des Uterusgewichts auf das Dreifache. Nr. 6 stammt von einem Kaninchen, das unter gleichen Bedingungen 5 mg unseres reinsten Produkts erhalten hatte. Bemerkenswert ist die überraschend gute Abhängigkeit des Uterusgewichts von der Menge der injizierten Substanz. Diese Verhältnisse ändern sich allerdings, sobald man nicht mehr Tiere gleichen Wurfes benutzen kann, und diese Forderung läßt sich bei größeren Arbeiten natürlich nicht erfüllen.

Der Vorteil der Uterusmethode besteht darin, daß wegen der Unempfindlichkeit der Kaninchen gegenüber Injektionen körperfremder Stoffe die Anwendung selbst erheblicher Substanzmengen möglich ist und so die Entscheidung über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Feminin erleichtert wird.

Abstrichmethode an der Maus. Die normale Maus durchläuft in etwa 4 bis 6 Tagen einen Brunstzyklus, der durch den Scheidenabstrich

gut kontrollierbar ist. Man unterscheidet nach *Allen* und *Doisy*[1]) vier Stadien: den Diöstrus, das Stadium der relativen Ruhe, das im Abstrich durch mehr oder weniger zahlreiche Leucocyten und einzelne Epithelien gekennzeichnet ist, den Proöstrus, das Stadium der beginnenden Brunst mit zahlreichen Epithelien, denen meist viele Leucocyten beigemengt sind, den Östrus, das eigentliche Brunststadium, das durch das Auftreten zahlreicher mit Eosin gut färbbarer kernloser Epithelien (Schollen) charakterisiert ist, und den Metöstrus, in dem Leucocyten und Epithelien untermischt mit Schollen das Bild beherrschen. Nach einem weiteren Tage erscheint das Bild des Diöstrus von neuem.

Bei der kastrierten Maus fehlt dieser Zyklus völlig; es herrscht das einförmige Bild des Diöstrus. Diejenige Menge Hormon, die imstande ist, bei der Ratte oder Maus einmal den Zyklus zum Ablaufen zu bringen, nennen *Allen* und *Doisy* eine Rattenbrunsteinheit (R.-E.) oder Mäusebrunsteinheit (M.-E.).

So einfach die Abstrichmethode im eben geschilderten Schema auch aussieht, so ergeben sich doch bei der praktischen Ausführung gewisse Schwierigkeiten.

Die Schollen, die von den meisten Beobachtern als das charakteristische Anzeichen der Brunst bezeichnet werden, verschwinden selten gänzlich aus dem Abstrich, ja, können mitunter auch außerhalb der Brunst ziemlich zahlreich werden. Bei der großen Wichtigkeit, die die Abstrichmethode für alle Arbeiten auf dem Gebiete des weiblichen Sexualhormons erlangt hat, ist es notwendig, etwas ausführlicher über die Erfahrungen der bisherigen Bearbeiter und unsere eigenen Beobachtungen zu sprechen.

Laqueur definiert eine Mäuseeinheit als die kleinste Menge Hormon, die stets imstande ist, „bei wenigstens zwei von drei gleichzeitig benutzten kastrierten Mäusen eine unzweifelhafte zyklische, das ist wieder spontan zurückgehende Veränderung des Vaginalepithels hervorzurufen, und zwar eine derartige, daß der Höhepunkt der Veränderung mindestens das von *Allen* und *Doisy* genannte proöstrische Stadium überschritten hat". Die Einspritzung nimmt *Laqueur* in drei Dosen im Abstand von 4 Stunden vor, und zwar an Tieren, die wenigstens 25 Tage kastriert und in dieser Zeit täglich durch Vaginalabstriche beobachtet worden sind. Er hält das echte Brunststadium für gekennzeichnet durch das fast gänzliche Verschwinden der Leucocyten im Abstrich und durch das massenhafte Auftreten von Epithelien, von denen die Hälfte kernlos sein muß. Er sichert die Objektivität seiner Befunde durch Prüfung seiner Präparate durch zwei Personen, die beide über den Gang der Untersuchung nicht unterrichtet sind. *Laqueur* unterscheidet $++$-, $+$-, $+-$- und $-$-Stadien, rechnet aber bei der Verwertung der Resultate $++ = +$, $+- = -$.

Loewe versucht, jede Unklarheit in der Bewertung des Abstrichs zu vermeiden, indem er die Menge der Schollen gegenüber den anderen Zellelementen durch Auszählen festlegt und die Wirksamkeit des Extrakts in Abhängigkeit zu dem prozentualen Anteil der Schollen an dem Gesamtbilde setzt. Er findet im Abstrich der unbehandelten kastrierten Maus bis zu

[1]) *Allen* und *Doisy*, Journ. of the Amer. Med. Ass. **81**, 819, 1921; Amer. Journ. of Anat. **34**, 133, 1924/25; Journ. of biol. Chem. **61**, 709, 1924.

30 Proz. Schollen und bezeichnet die Dosis, die eine Vermehrung des Schollenanteils auf 90 Proz. bewirkt, als 1 M.-E. Die zwischen 30 und 90 Proz. Schollenanteile enthaltenden Abstriche wertet er mittels eines Bologramms aus. Er ist so in der Lage, die Wirksamkeit eines Extrakts auf mindestens 10 Proz. einer Mäuseeinheit zu beurteilen.

Zondek und *Aschheim*[1]) erklären einen Versuch nur dann für positiv verlaufen, wenn auf dem Höhepunkt der Wirkung der Abstrich zahllose Schollen ohne Beimengung irgendwelcher anderen Zellarten enthielt. Sie unterscheiden nur positive und negative Versuche und sind der Meinung, daß + —-Angaben und der Versuch, die Brunsteinheit in Prozente zu zerlegen, zu verwerfen sind; sie erklären Teilbrunstzustände für eine physiologische Unmöglichkeit. Nach ihren Erfahrungen sind die Mäuse 6 Wochen vor der Kastration auf das regelmäßige Eintreten der Brunst und 6 Wochen danach auf das völlige Ausbleiben zu untersuchen.

Zwischen *Laqueur* und *Zondek* hat sich eine rege Debatte entsponnen, welcher von den genannten Abstrichen als entscheidend für die Beurteilung betrachtet werden soll. Wir möchten *Zondek* insofern zustimmen, als es theoretisch am schönsten wäre, nur das Bild des reinen Schollenabstrichs mit positiv zu bezeichnen; wir halten aber diese Forderung praktisch für nicht gut durchführbar. Der reine Schollenabstrich findet sich häufig nicht länger als 12 Stunden. Sein Auftreten während der Nacht würde sich also der Beobachtung entziehen; der Abstrich am nächsten Morgen zeigt dann viele Schollen, aber auch schon Epithelien und Leucocyten. Ein solcher Abstrich würde nach *Zondek* mit negativ zu bezeichnen sein und diese Beurteilung so ein falsches Bild liefern. Wir glauben daher, daß die *Laqueur*schen Anforderungen, die nicht nur das reine Schollenstadium, sondern auch das kurz Vorhergehende oder Folgende in Betracht ziehen, am zweckmäßigsten sind.

Wir hielten uns im wesentlichen an die Vorschrift *Laqueurs* und wichen nur insofern von ihr ab, als wir die Tiere nur einmal in der Regel am Vormittag mit dem zu untersuchenden Extrakt spritzten. Wir verwandten stets zwei Tiere zum Versuch und bezeichneten ihn als positiv, wenn beide Tiere das von *Laqueur* umrissene Bild des Brunstabstrichs zeigten, mit + —, wenn ein Tier reagierte, das andere nicht, oder beide das Stadium des Proöstrus nicht überschritten hatten. Wir glaubten diese Änderungen deshalb ohne Schaden vornehmen zu dürfen, als es sich bei unseren Versuchen nicht um die Auswertung eines einmalig hergestellten Extrakts handelte, sondern um die systematische Prüfung von Extraktfraktionen, wie sie im Verlaufe der chemischen Reinigung abfielen.

Wir nahmen die Abstriche mit einem dünnen, mit einem Knöpfchen versehenen Glasstab vor, den wir nach dem Abstrich mit einem Tropfen Wasser sorgfältig auf einen Objektträger abspülten und durch vielfaches Wenden im Tröpfchen gründlich reinigten. Nach dem Trocknen färbten wir mit Hämatoxylin und Eosin. Methylenblaufärbung erwies sich als ungünstig. Für jeden Abstrich verwenden wir einen frisch ausgekochten Glasstab.

---

[1]) *Zondek* und *Aschheim*, Klin. Wochenschr. 1926, S. 979.

Eine dauernde Kontrolle sämtlicher Tiere haben wir stets durchgeführt. Der Abstrich der kastrierten Tiere zeigte gewöhnlich ein leeres Bild. Meist traten nur wenig Leucocyten auf, daneben vereinzelt Epithelien und Schollen. Häufig änderte sich das Bild nach der Injektion in den ersten Tagen gar nicht. Der Abstrich blieb leer, um dann am dritten Tage, manchmal aber auch erst am vierten und fünften Tage zahllose eng beieinander liegende Schollen zu zeigen. Manchmal traten nur Schollen auf; in anderen Fällen fanden sich neben dichten Lagen von Schollen auch noch Leucocyten und Epithelien in verschiedenem Ausmaße, zuweilen fand sich ein die Schollen verbindender Schleim. Alle diese Abstriche bezeichneten wir als positiv. Wir möchten nicht wie *Loewe* in der Steigerung des prozentualen Anteils der Schollen gegenüber den anderen Zellelementen das charakteristische Anzeichen der Brunst erblicken, sondern vielmehr in ihrer so auffälligen absoluten Vermehrung. Die Bilder wechseln so schnell, daß es notwendig ist, die Abstriche zweimal am Tage — morgens und abends — vorzunehmen.

Der individuelle Einfluß der Tiere macht sich häufig störend fühlbar. Alter, durch Inzucht gesetzte Eigentümlichkeiten und die Zeit, die nach der Kastration vergangen ist, spielen vielleicht eine Rolle. *Guggisberg*[1]) bemerkt für das Kaninchen, daß sonst wirksame Extrakte bei Tieren, die vor mehr als 3 Monaten kastriert worden sind, die Uterusatrophie nicht mehr aufzuheben vermögen. Jedenfalls ist es keine seltene Erscheinung, daß die Tiere ungleichmäßig ansprechen. Während einzelne Mäuse mit der halben Dosis positiv oder zweifelhaft reagieren, liefern andere selbst mit der ganzen Dosis noch keine positiven Abstriche. Alle Angaben in Mäuseeinheiten stellen für uns daher keine absoluten Werte dar, sondern Zahlen, die nur der Größenordnung nach zu beurteilen sind.

Wachstumsöl und Brunststoff.

Die eben besprochenen Methoden sind bisher sehr wenig nebeneinander benutzt worden. Nach der Einführung der Abstrichmethode kam die Uterusmethode bei den meisten Bearbeitern in einen unverdienten Mißkredit und wurde nur gelegentlich angewandt. Es stehen sich daher einige Resultate gegenüber, die mit der Uterusmethode von den einen Beobachtern und mit der Abstrichmethode von anderen Beobachtern gefunden worden sind, und die sich zum Teil widersprechen.

Fellner[2]) hatte Hoden- und Eierextrakte als das Uteruswachstum stimulierend bezeichnet, *Schroeder* und *Goerbig*[3]) Leberextrakte im selben

---

[1]) *Guggisberg*, Schweiz. med. Wochenschr. 1925, S. 114.

[2]) *Fellner*, Arch. f. Physiol. 189, 199, 1921; Münch. med. Wochenschr. 1925, S. 1582.

[3]) *Schröder* und *Goerbig*, Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäk. 88, 1921.

Sinne wirksam gefunden. Nach *Zondek*[1]) und *Steinach*[2]) erwiesen sich aber Hoden- und Leberextrakte als untauglich, um den Brunstzyklus an der kastrierten Maus von neuem hervorzurufen. *Allen* und *Doisy*[2]) konnten mit Extrakten aus Eiern nur sehr fragliche Erfolge an der Maus erzielen. *Loewe*[3]) ist dieser entgegenstehenden Resultate wegen zu der Ansicht gelangt, daß es zwei in ihrer Wirkung sich zum Teil überdeckende Hormone geben müsse. Er unterscheidet ein Wachstumsöl, das mit dem *Fellner*schen Feminin identisch sein soll, und das nicht imstande ist, den Brunstzyklus auszulösen, und einen Brunststoff, der allein die Gesamtheit der für das Sexualhormon charakteristischen Wirkungszeichen hervorzurufen vermag.

Unsere Prüfung von Hoden-, Eier- und Leberextrakten[4]) am Uterus des Kaninchens verliefen — wie wir in einem Abschnitt weiter unten näher ausführen — negativ. Ein Gehalt an Hormon dürfte, wenn ein solcher überhaupt vorhanden ist, sicher unter 20 bis 40 M.-E. für 1000 g Hoden liegen. Ebenso würden wir im Ei und der Leber das Feminin haben nachweisen können, wenn in 20 Eigelb oder 1000 g Leber die genannte Hormonmenge vorhanden gewesen wäre. Zum Vergleich führen wir an, daß nach unseren Versuchen 1 kg Placenta rund 700 M.-E. enthält.

Weiter versuchten wir, die Resultate der Uterusmethode mit denen der Abstrichmethode in wechselseitige Beziehung zu bringen. Blieb bei einer ausschließlich nach der Abstrichmethode erfolgten Reinigung eines Extraktes, der sicher Wachstumsöl enthielt, doch das beim Rohextrakt gefundene Verhältnis zwischen M.-E. und Wachstum des Uterus erhalten, so war für die Annahme eines gemeinsamen Ursprungs beider Wirkungen eine wesentliche Stütze gewonnen.

Wir gingen von einem Placentaextrakt aus, den wir durch Extraktion mit Äther gewonnen hatten, und der also nach *Loewe* Wachstumsöl enthalten mußte. Weiter oben haben wir bereits über seine Wirksamkeit am Kaninchen berichtet und wiederholen hier nur kurz, daß Injektionen von 0,5, 0,10, 0,20 und 0,40 g das Gewicht der Uteri von vier Tieren auf: 0,17, 0,24, 0,51 und 0,98 g in 6 Tagen brachten. Uterusgewicht des Vergleichstieres = 0,06 g. Wirksamkeit des Extraktes 4 bis 8 mg/M.-E.

Injektionen zwischen 5 bis 100 M.-E. steigerten also die Gewichte der Uteri auf das 3- bis 16fache. Zum Vergleich wurde ein Extrakt am Kaninchen und Maus geprüft, dessen Wirksamkeit durch eine Reinigung, die nur an der Maus verfolgt worden war, sich auf 0,1 bis 0,2 M.-E. erhöht hatte. Drei Kaninchen des gleichen Wurfes erhielten 1, 2 und 4 mg, zwei andere Kaninchen anderer Würfe 5 und 10 mg. Die Gewichte der Uteri am siebenten Tage wurden zu 0,32, 0,41, 0,47, 0,95 und 0,63 g gefunden. Eine wenig befriedigende Übereinstimmung, die aber doch erkennen läßt, daß die

---

[1]) *Zondek*, Klin. Wochenschr. 1926, S. 1218.
[2]) Zitiert nach *Loewe*.
[3]) *Loewe*, Zentralbl. f. Gynäk. 50, 551, 1926.
[4]) *Schroeder* und *Goerbig* verwendeten Leber von Menschen, männlichen oder weiblichen Leichen, wir dagegen Rinderleber.

gleichen Dosen von 5 bis 100 M.-E. Steigerungen des Uterusgewichts von derselben Größenordnung hervorriefen, wie bei dem ungereinigten Extrakte.

Auf Grund dieser Beobachtungen halten wir den Versuch, zwischen einem Wachtumsöl und einem Brunststoff unterscheiden zu wollen, vorläufig für nicht gerechtfertigt.

Darstellung von Placentaextrakten.

Die frischen Placenten wurden von der Nabelschnur und den Eihäuten befreit, leicht zerdrückt und 24 Stunden in strömendem Wasser gewaschen, um sie vom Blute zu befreien. Nach dem Waschen wurden sie ausgepreßt, durch die Fleischmaschine geschickt und bei niedriger Temperatur getrocknet. Die getrockneten Placenten wurden fein gemahlen und 24 Stunden mit Äther im Soxleth extrahiert.

Wir beschreiben im folgenden die Aufarbeitung eines Ansatzes von 3430 g Trockensubstanz. Die vereinigten ätherischen Auszüge sind von tiefbrauner Farbe, sie werden von mitgerissenen Gewebsstückchen abfiltriert und auf — 10° gekühlt. Der entstehende weiße Niederschlag ist schwer filtrierbar, ein kleiner Zusatz von Kohle bringt ein blankes Filtrat. Nach dem Abtreiben des Äthers hinterbleiben 205,6 g dunkelbraunes Öl. Beim Stehen auf Eis erstarrt es zu einer dicken Masse. Das Öl wird in 2 Liter Aceton gerührt. Es fallen Flocken, die sich zu einem schwarzen Satz zusammenballen. Die ausgefallenen Phosphatide werden in wenig Äther gelöst und nochmals in Aceton gerührt. Dieses Mal färbt sich das Aceton nur noch leicht. Aceton-Unlösliches (Fraktion I) 33 g. Auf eine chemische Untersuchung dieser und der anderen abfallenden Fraktionen mußten wir vorläufig verzichten. Die Acetonlösung ist orangebraun und wird auf — 15° gekühlt. Es fallen noch Phosphatide, daneben Fette und Fettsäuren aus. Sie werden im Kältetrichter bei — 15° abfiltriert, zweimal in Aceton gelöst und gefällt; Fraktion II 28 g. Die jetzt ganz durchsichtige Acetonlösung wird mit konzentriertem Ammoniak so lange versetzt, bis nichts mehr ausfällt und die Lösung lackmus-alkalisch reagiert. Der entstehende Niederschlag ist fast weiß und löst sich im Wasser unter Schäumen Fraktion III 37 g. Beim Kühlen auf — 15° fällt ein brauner fettähnlicher Körper aus, der sich nach dem Absaugen auch im warmen Aceton kaum noch auflöst; Fraktion IV 23 g.

Das Aceton wird abgedunstet. Es bleibt ein Öl zurück, das auch auf Eis nicht kristallisiert. Es wird in ½ Liter Alkohol gegossen, auf — 12° gekühlt und bei dieser Temperatur filtriert; Fraktion V 8 g.

Der Alkohol wird im Vakuum verjagt und das zurückbleibende Öl in 400 ccm Methylalkohol gerührt, auf — 12° gekühlt und bei derselben Temperatur abgesaugt; Fraktion VI 5 g. Nach dem Abdunsten des Methylalkohols wird in Äther gelöst und mit Wasser ausgeschüttelt. Die erste Ausschüttelung färbt sich tief braun, die dritte ist schon meist farblos. Nach dem Verdampfen des Äthers erhielten wir 39 g Rohextrakt.

Der Rohextrakt ist ein ziemlich leicht bewegliches Öl von schwarzbrauner Farbe und nicht unangenehmem Geruch. Er ist in den üblichen organischen Lösungsmitteln leicht löslich, nur mit Petroläther fällt ein brauner Niederschlag aus. In Olivenöl löst er sich bis auf einen braunen Satz. Alkoholische Lösungen von Cadmiumchlorid und Pikrinsäure geben keinen Niederschlag. Mit alkoholischem Digitonin erfolgt eine

starke Fällung von Cholesterin-Digitonid. Die Prüfung an der Maus ergab eine Wirksamkeit von 2 bis 4 mg M.-E.

Bedeutungsvoll für die schnelle Gewinnung hoch aktiver Präparate aus dem Rohextrakt scheint uns die Beobachtung, daß der Rohextrakt mit sehr viel Petroläther einen Niederschlag liefert, der das Feminin in erheblich höherer Konzentration enthält als der Rohextrakt selbst. Es fallen durch Petroläther etwa ein Viertel bis die Hälfte der gesamten Hormonmenge aus. Ob das Feminin selbst in Petroläther unlöslich ist oder von den anderen in Petroläther unlöslichen Beimengungen mitgerissen wird, können wir vorläufig nicht entscheiden. Die Verarbeitung der in Petroläther unlöslichen Fraktion, die wir als erste in Angriff nahmen, gestaltet sich darin vorteilhaft, als sie kein störendes Öl enthält, das sonst den Gang der Reinigung so sehr erschwert.

Leider ist festzustellen, daß trotz aller Vorsicht beim Arbeiten die Gesamtmenge des Hormons ständig kleiner wurde. Ob Zersetzungen auftraten, oder ob sich schädigende oder hemmende Wirkungen anderer Art bemerkbar machten, können wir vorläufig nicht übersehen. Ein Teil des Verlustes beruht sicher darauf, daß die Abfälle stets etwas Feminin zurückhielten und von diesem nicht zu befreien waren.

10 g Öl werden in die 300fache Menge Petroläther eingerührt und 24 Stunden stehen gelassen. Die während des Eingießens auftretende Emulsion oder Suspension hat sich dann als brauner Bezug an den Wandungen des Gefäßes abgesetzt. Die Flüssigkeit ist blank. Sie wird abgegossen und der abdestillierte Petroläther zur Fällung einer neuen Portion Öl verwandt. Aus den 39 g Rohextrakt erhielten wir auf diese Weise 3,6 g eines in Chloroform löslichen Harzes von erheblich höherer Wirksamkeit als das Ausgangsprodukt. Bei der Aufbereitung eines kleinen Anteils betrug die Aktivität z. B. 0,6 bis 0,7 mg/M.-E.

Dieses Harz löst sich in ammoniakalischem Wasser leicht mit brauner Farbe auf. Die Lösung ist klar und setzt selbst bei tagelangem Stehen nur winzige Fädchen ab. Bei der Aufarbeitung von Placentaextrakten waren wir vor einiger Zeit[1]) zu sehr wirksamen Fraktionen gekommen, die genau dieselben Eigenschaften aufwiesen, d. h. ganz klare oder in anderen Fällen fast klare Lösungen in Ammoniak mit brauner Farbe lieferten. Wir hielten damals diese Wasser- oder Alkalilöslichkeit einer so aktiven Substanz für schwer vereinbar mit einem Lipoidcharakter des Hormons. Auf Grund gleich zu besprechender Erfahrungen möchten wir aber in diesem Punkte sehr zurückhaltend sein.

Das Harz ist keineswegs einheitlich. Die Hauptmenge ist in Äther löslich, der ätherunlösliche Teil (0,4 g) ist nur schwach wirksam an der Maus. Er liefert mit wässerigem Ammoniak tief schwarze Lösungen. Das in Äther Lösliche ist eine braune, ziemlich zähe Paste, die sich in schwach

---

[1]) Diese Zeitschr. **166**, 155, 1925.

ammoniakalischem Wasser spielend löst. Zur weiteren Aufarbeitung wird die braune ammoniakalische Lösung mehrfach mit Äther ausgezogen, bis er sich nicht mehr anfärbt. Die Zugabe von wenig Natriumsulfat erleichtert eine bessere Trennung der Schichten. Beim Verdunsten des Äthers hinterbleibt eine braune Schmiere, $W = 0{,}3$ bis 0,4 mg/M.-E.

Diese Schmiere löst sich nun nicht mehr in ammoniakalischem Wasser auf, sondern liefert eine ziemlich trübe Emulsion, die nach einiger Zeit absetzt. Aus der klaren ammoniakalischen Lösung ist also durch einfaches Ausäthern ein sehr aktives wasserunlösliches Präparat gewonnen worden. Dieses Wasserunlösliche beträgt mehr als 20 Proz. der ursprünglich wasserlöslichen Fraktion.

Der in ammoniakalischer Lösung gebliebene Hauptanteil fällt durch Ansäuern als festes braunes Harz aus, das sich in Ammoniak wieder klar löst. $W < 3$ mg/M.-E.

Der Versuch durch Zusammengeben der beiden so entstandenen Fraktionen die Emulsion in eine echte Lösung überzuführen, gelang nicht.

Die Emulsion wird mit ammoniakalischem Bleiacetat versetzt. Es fällt eine dicke braune Schmiere aus, die nach dem Absaugen und Waschen schwach getrocknet und in Äther gelöst wird, wobei nur ein sehr kleiner Rückstand bleibt. Die ätherische Lösung wird in Alkohol gegossen; es entsteht eine sich langsam absetzende Suspension. Das in Alkohol Lösliche und das in Alkohol Unlösliche werden in derselben Weise aufgearbeitet. Sie werden mit alkoholischer Salzsäure im Überschuß versetzt, vom ausgeschiedenen Bleichlorid abfiltriert, das Filtrat schwach ammoniakalisch gemacht und der Alkohol fast ganz vertrieben. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit Wasser ausgeschüttelt. Das in Alkohol Lösliche gab mit Salzsäure nur sehr wenig Bleichlorid und lieferte 0,54 g Substanz. Die in Alkohol unlösliche Bleiverbindung schied mit Salzsäure viel Bleichlorid aus und lieferte 0,14 g. $W < 0{,}6$ mg/M.-E.

Die weiteren Operationen, die jede einzelne immer nur von geringer Aktivitätssteigerung begleitet war, bestanden in gründlichem Ausziehen mit Petroläther (Petrolätherlösliches $W = 0{,}7$ bis 1,0 mg/M.-E.), Umlösen aus 75proz. Äthyl- und Methylalkohol. Die wirksamste Fraktion war ein in 75proz. Methylalkohol lösliches gelbliches Öl, das mit Ammoniak Emulsionen lieferte. $W = 0{,}1$ bis 0,2 mg/M.-E.

Auch dieses hochwirksame Produkt war noch nicht einheitlich, weswegen wir auch auf die Mitteilung der ausgeführten qualitativen Proben verzichten. Wir wollen nur die Beständigkeit des Feminins gegen Wärme, die Temperaturen von 100^0 und darüber mit Sicherheit erträgt, hervorheben. Das Feminin ist gegen verdünnte Alkalien und Säuren durchaus beständig und wird durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff in seiner Wirksamkeit nicht wesentlich beeinträchtigt.

Hormongehalt der Placenta.

Über den Hormongehalt der Placenta liegen bislang nur zwei Angaben vor. *Allen* und *Doisy* geben den Gehalt eines Kilogramms Pla-

centa auf 400 bis 700 R.-E. an; nach *Loewe* enthält eine reife Placenta mehr als 300 M.-E.

Die Extraktion des Placentapulvers mit Äther, die wir anfänglich anwandten, holt bei weitem nicht alles Feminin aus der Placenta heraus. Wir erhielten aus 3430 g Placentatrockenpulver 39 g Rohextrakt. $W = 2$ bis 4 mg/M.-E. Die 39 g enthielten also 10000 bis 20000 M.-E. Die im Laufe der Reinigung abgefallenen Ballaststoffe wurden ebenfalls geprüft, enthielten aber praktisch zu vernachlässigende Mengen Hormon. Nur die Fraktionen III und IV (siehe vorhergehenden Abschnitt) zeigten sich aktiv. Die Injektion des 30. Teiles beider Fraktionen (1,2 und 0,8 g) bewirkte eine Wachstumssteigerung des Uterus auf 0,48 g.

1 kg mit Äther erschöpftes Placentapulver wurde 24 Stunden im Soxleth mit Chloroform ausgezogen und lieferte nach der Reinigung 7 g eines braunen Öles. $W = 3$ bis 6 mg/M.-E.; also 1200 bis 2400 M.-E. für 1 kg Placentapulver.

Auch das Chloroform erschöpft das Placentapulver noch nicht völlig. 350 g mit Äther und Chloroform ausgezogenes Placentapulver wurde mehrere Stunden mit Alkohol ausgekocht. Der Alkohol färbte sich sofort braun und lieferte beim Abdunsten 8,0 g Erstextrakt, der bei der Aufarbeitung 1,5 g Rohextrakt lieferte. Nach der Prüfung am Kaninchen enthielt dieser Rohextrakt etwa 100 bis 150 M.-E.

Der wässerige Auszug des durch die drei organischen Lösungsmittel extrahierten Placentapulvers enthielt keine nachweisbare Menge Feminin.

Durch Extraktion mit Äther, Chloroform und Alkohol waren also rund 4500 bis 9000 M.-E. aus 1 kg Placentatrockenpulver zu ziehen.

Zur Kontrolle des gefundenen Wertes wurden 200 g Placentapulver erschöpfend mit Chloroform und Alkohol ausgezogen und die vereinten, nicht verarbeiteten Extrakte (20,6 g) an der Maus geprüft. Es reagierten bei einer Injektion von 0,010 g zwei Mäuse negativ, bei 0,020 g eine Maus +, eine Maus + —; bei 0,040 g eine Maus + +, eine Maus + —. Die Wirksamkeit des Extrakts betrug also etwa 20 mg/M.-E. Nach dieser Versuchsreihe würde in 1 kg Placentapulver etwa 5000 M.-E. enthalten sein. Ein Befund, der in der Spanne der erstgenannten Werte liegt.

18 frische, von den Eihäuten befreite Placenten wogen 5940 g und gaben 660 g Trockensubstanz. Der Hormongehalt einer Placenta berechnet sich danach auf 170 bis 340 M.-E. und der von 1 kg frischer Placenta auf 500 bis 1000 M.-E.; das ist erheblich weniger, als *Allen* und *Doisy* gefunden haben; denn 1 R.-E. entspricht 4 bis 8 M.-E.

Perorale und perkutane Wirksamkeit.

Nach *Allen*[1]), *Dickens* und *Dodds*[2]) und *Papanicolaou*[3]) ist das Hormon bei Gaben durch den Mund unwirksam. *Fellner* berichtet von positiven Erfolgen am Kaninchen bei peroraler und perkutaner Anwendung. *Zondek* hat durch Fütterung von subkutan wirksamen Extrakten den Brunstzyklus

[1]) *Allen* und Mitarbeiter, Amer. Journ. of Anat. **34**, 133.

[2]) *Dickens* und *Dodds*, Biochem. Journ. **19**, 853.

[3]) *Papanicolaou*, Proc. of the exper. biol. and med. **22**, 106; Ber. ges. Physiol. **32**, 115.

an der Maus wieder auslösen können; ähnliches berichtet auch *Loewe*. Bei der Wichtigkeit dieser Frage haben wir einige Versuche am Kaninchen in dieser Richtung angestellt.

Kaninchen 39 erhielt am 10. Juni 1,8 g und am 12. Juli 2,7 g Extrakt in 10proz. ammoniakalischer Emulsion in den Magen, zusammen also 4,5 g, die etwa 1000 M.-E. entsprachen. Das Tier wurde am 15. Juni getötet; der Uterus wog 0,9 g. 0,5 g der gleichen Substanz subkutan injiziert gaben bei einem anderen Kaninchen in der gleichen Zeit einen Uterus von 0,5 g.

Man darf die Wirksamkeit des Feminins bei peroraler Darreichung auf etwa den 5. bis 10. Teil derjenigen bei subkutaner Injektion schätzen; *Loewe* gibt sie geringer auf den 20. Teil an.

Der Effekt bei Einreibung auf die Haut scheint noch erheblich kräftiger zu sein. Kaninchen 49a wurde das Haar am Nacken an einer Stelle, an der es sich nicht lecken konnte, geschoren, und die enthaarte Stelle am 19., 20. und 21. Juli mit zusammen 1,8 g Substanz (300 M.-E.) eingerieben. Die Haut ist nach den ersten 24 Stunden rot und schrumpelig später wird sie hart und lederartig. Am 24. Juli wiegt der Uterus 1,1 g. Bei einem zweiten Versuch erhielt Tier 49b 1,6 g des gleichen Extraktes im Verlauf von 3 Tagen in die Haut gerieben; der Uterus wog am siebenten Tage 1,2 g.

Corpus luteum-Extrakte.

Allen und *Doisy* fanden Corpus luteum-Extrakte unwirksam an der kastrierten Maus und am Kaninchenuterus im scharfen Gegensatz zu *Fellner*, *Herrmann* u. a., die mit diesem Ausgangsmaterial sehr gute Wachstumserfolge am Kaninchen aufzuweisen gehabt hatten. Die Frage über den Hormongehalt des Corpus luteum scheint nach den neueren Befunden recht kompliziert.

Papanicolaou gibt an, daß Corpus luteum-*Lipoide*, die per os unwirksam sind, injiziert, *Rückgang* der großen Follikel, Aufhören der Ovulation und Unterdrückung der Brunsterscheinung bewirken. Extrakte aus *Follikeln* und restlichem Ovarialgewebe entwickeln die kongestive, wachstumssteigernde Wirkung am Genitaltrakt. Die *wasserlösliche* Fraktion alkoholischer Extrakte ganzer Ovarien *mit* Corpus luteum, die auch per os gering wirksam sind, regeln die zyklische ovarielle Funktion, ohne zu den hypertrophierenden Brunsterscheinungen zu führen. *Kennedy* gibt an, daß mit Kochsalzlösung angesetzte Extrakte von Corpus luteum von Kühen bei intravenöser Einspritzung beim Kaninchen die Ovulation für 3 Monate hemmen. Die Auffassung von der Abgabe zweier antagonistisch wirkender — den Menstruationszyklus hemmender und beschleunigender — Stoffe aus dem Corpus luteum haben *Wintz*[1]), *Seitz*, *Wintz* und *Fingerhut*[2]) bereits 1914 hervorgehoben. Die *Wintz*schen Arbeiten führten zur Abscheidung der beiden Stoffe aus dem Corpus luteum und ihrer Trennung voneinander.

[1]) *Wintz*, Arch. f. Gynäk. 1920, S. 457; Deutsch. med. Wochenschr. 1924, S. 67.

[2]) *Seitz*, *Wintz* und *Fingerhut*, Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 1657, 1734.

Als Agomensin und Sistomensin werden sie in der Therapie sehr geschätzt, haben sich aber bei der Prüfung am Tiere als unwirksam erwiesen.

Unsere Erfahrungen über Corpus luteum-Extrakte beschränken sich auf einige Versuche, die der eine von uns (*Wadehn*) auf Anregung von Prof. *Wintz* seinerzeit in Erlangen anstellte. Je ein kastriertes und normales Kaninchenweibchen und -männchen erhielten im Laufe eines Monats 2,6 g Corpus luteum-Extrakt injiziert. Der Erfolg war deutlich positiv. Die Brustwarzen sämtlicher gespritzten Tiere waren stark vergrößert. Besonders deutlich war der Unterschied zwischen den beiden kastrierten weiblichen Tieren. Während bei dem kastrierten nicht gespritzten der Uterus verkümmerte und die Brustwarzen sehr klein blieben, zeigte das gespritzte gute Ausbildung des Uterus und der Warzen. Die Hoden des männlichen gespritzten Tieres waren stark an Größe hinter denen des Vergleichstieres zurückgeblieben. Bei beiden gespritzten Männchen war die Verkümmerung des Penis sehr auffallend.

Extrakte aus Ausgangsmaterial verschiedener Herkunft.

Erfolgreiche Versuche, aus anderen Stoffen als den mit den weiblichen Sexualfunktionen in Beziehung stehenden Organen wirksame Zubereitungen zu erhalten, sind nur vereinzelt berichtet. *Schroeder* und *Goerbig*[1]) stellten nach dem *Herrmann*schen Verfahren aus menschlicher Leber einen Extrakt her, der den zehnten Teil der Wirksamkeit ihres auf demselben Wege hergestellten Placentaextraktes zeigte. *Fellner*[2]) gibt an, daß Extrakte aus Stierhoden eine ähnliche stimulierende Wirkung auf den Uterus ausüben wie Placentaextrakte. Auch in Hühnereiern und Eierstöcken von Fischen konnte *Fellner* das Feminin nachweisen. Es entsprach der Extrakt von 30 Eiern dem von zwei Placenten. Beachtenswert erscheinen die Angaben von *Evans* und *Burr*[3]) über ein „antisteriles" fettlösliches Vitamin E, das besonders auf die Entwicklung der Keimdrüse und die Geschlechtsfunktionen wirken soll. Sie gewannen es aus Weizenkeimen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und reinigten es durch Verseifen mit kalter Kalilauge, Umlösen aus Pentan und Methylalkohol und fraktionierter Destillation im Vakuum.

Angaben, nach denen aus leicht zugänglichen und in großen Mengen erreichbaren Stoffen hormonhaltige Zubereitungen zu erzielen sind, scheinen uns besonderer Aufmerksamkeit wert.

Nach *Allen* und *Doisy* enthält 1 kg der besonders hormonreichen Follikelflüssigkeit etwa 2000 R.-E. *Laqueur* berichtet über einen Gehalt der Follikelflüssigkeit von nur 600 bis 1600 M.-E., das sind 100 bis 300 R.-E., wenn man nach *Laqueur* eine R.-E. = 4 bis 8 M.-E. setzt. Wenn man nun bedenkt, daß nach *Allen* und *Doisy* auf sechs bis acht

---

[1]) a. a. O.

[2]) a. a. O.

[3]) *Evans* und *Burr*, Proc. Nat. Acad. Sc. Wash. 2, 334; Chem. Centralbl. **1925**, II, 2000.

Schweineovarien ein Ovar mit sprungreifem, etwa 2 ccm enthaltendem Follikel kommt, so ist leicht zu ersehen, daß zur Gewinnung von 1000 R.-E. die Schlachtung von etwa 900 weiblichen Schweinen notwendig ist. Folgt man den Angaben *Laqueurs*, der den durchschnittlichen Gehalt auf etwa den zehnten Teil der amerikanischen Autoren angibt, so müßte sich diese Anzahl noch entsprechend vermehren. Eine Verwendung von Follikelflüssigkeit für therapeutische Zwecke größeren Umfangs ist daher eine sehr beschränkte. Nicht viel günstiger liegen die Verhältnisse bei der Gewinnung des Feminins aus der Placenta.

Unsere Versuche, aus den von den anderen Autoren angegebenen Substraten (Hoden, Leber, Hühnereiern) wirksame Zubereitungen zu erhalten, sind, wie bereits kurz berichtet, negativ verlaufen.

Wir arbeiteten 1530 g getrocknete Stierhoden (60 Stück) nach dem bei der Placenta bewährten Verfahren auf; es resultierten dabei 56 g Rohöl. Kaninchen 1a (Gewicht 1025 g) erhält vom 8. bis 15. März 1,2 g Rohextrakt. Es wird am 29. März getötet; der Uterus ist nicht gewachsen. Kaninchen 1b (Gewicht 665 g) erhält vom 27. April bis 12. Mai 2,0 g Rohextrakt. Uterus am 13. Mai = 0,10 g. Weiter waren je 0,1 g Extrakt an vier kastrierten Mäusen außerstande, den Brunstzyklus hervorzurufen. Die Nebenhoden waren vor der Aufarbeitung der Hoden abgelöst worden und wurden besonders extrahiert und gereinigt. Kaninchen 12 (Gewicht 240 g) vom 31. Mai bis 9. Juni mit 1,5 g gespritzt; Utrus am 10. Juni = 0,07 g.

Zur Prüfung der Anwesenheit des Hormons in Hühnereiern wurden zehn Eigelb von frisch gelegten Eiern in Alkohol gerührt, das Ausgefallene abfiltriert, getrocknet und mit Chloroform erschöpft. Die alkoholische Lösung und der Chloroformauszug wurden aufgearbeitet und ergaben 2,4 g Extrakt. Zwei Kaninchen wurden mit 0,6 g am ersten und dritten Tage zusammen mit je 1,2 g gespritzt und am siebenten und 14. Tage getötet. Die Uteri wogen 0,06 und 0,05 g, waren also nicht gewachsen. Die bei der Reinigung abgefallenen Stoffe (42 g) wurden ebenfalls am Kaninchen geprüft. Es erhielt am ersten, dritten und fünften Tage je 3 g Substanz. Es wurde am 13. Tage getötet. Der Uterus wog 0,06 g.

1½ kg Rinderleber wurden durch die Fleischmachine geschickt und der Brei in die doppelte Menge Alkohol gerührt. Nach 24stündigem Stehen wurde koliert, der Rückstand getrocknet und 250 g Trockensubstanz mit Chloroform erschöpft. Die aufgearbeiteten Alkohol- und Chloroformauszüge ergaben 10 g Extrakt. Zwei Kaninchen erhielten im Laufe von 7 Tagen je 4 g und wurden am 10. und 13. Tage getötet. Die Uteri wogen 0,09 und 0,06 g.

Unsere Auszüge aus Weizen- und Gerstenkeimlingen und Malzkeimen vermochten weder am Kaninchen noch an der Maus eine Wirkung auszulösen.

Wirkung des Feminins auf das männliche Tier.

Die Wirkung der hormonhaltigen Zubereitungen auf männliche Tiere sei kurz gestreift. *Fellner*[1]) und *Herrmann* und *Stein*[2]) beobachteten nach

---

[1]) *Fellner*, Arch. f. Physiol. 189, 199.

[2]) *Herrmann* und *Stein*, Zentralbl. f. Gynäk. 1919. S. 426; 1920, S. 1449.

der Behandlung männlicher Tiere mit ihren Extrakten Wachstum der Brustwarzen, Schrumpfung der männlichen Geschlechtsdrüsen und Aufhebung der Spermiogenese. *Schroeder* und *Goerbig*[1]) hatten einen gegenteiligen Erfolg. Sie sahen bei gleichzeitigem Wachstum der Brustwarzen eine unverkennbare Vergrößerung und Reifung der ableitenden Samenwege. Die Spermiogenese war nicht behindert.

Bei zwei Versuchen an ausgewachsenen männlichen Kaninchen mit kräftigen Dosen (3 g und darüber) Placentaextrakt konnten wir die Angaben *Fellners* über die stimulierende Wirkung auf die Brustwarzen und die zerstörende auf die männlichen Organe durchaus bestätigen. Die Angaben *Schr eders* veranlaßten uns, einen Versuch bei einem kleinen Tier und mit kürzerer Versuchsdauer zu unternehmen. Kaninchen 3 (Gewicht 600 g) erhielt vom 8. bis 20. Juni 0,7 g Placentarohextrakt. Am 21. Juni waren die Hoden des gespritzten Tieres gegenüber denen des Geschwistertieres stark durchblutet, ebenso lang, aber breiter. Auffallend war die Veränderung an den Nebenhoden, die gut doppelt so lang und beinahe noch einmal so dick waren als die des Normaltieres. Die Samenleiter waren deutlich stärker.

Diese Resultate waren mit unseren ersten Extrakten gewonnen, die noch recht unrein waren. Da es unmöglich ist, zu beurteilen, ob nicht die Verunreinigungen dieser Rohextrakte den Ausschlag nach der einen oder anderen Richtung hin beeinflußt haben, werden wir eine eingehende Nachprüfung der Wirkungsweise des Hormons am männlichen Tier mit unseren reinen Zubereitungen in Angriff nehmen.

Zusammenfassung.

1. Die beiden Methoden zur Beurteilung der Wirksamkeit von femininhaltigen Substraten — die Uterusmethode am Kaninchen und die Abstrichmethode an der kastrierten Maus — werden besprochen und eigene Erfahrungen mitgeteilt. Die Uterusmethode wird für qualitative Zwecke durchaus geeignet befunden; 5 bis 10 M.-E. bringen einen eben meßbaren Effekt am Kaninchenuterus hervor.

2. Die Unterscheidung zwischen zwei weiblichen Sexualhormonen, einem Wachstumsöl und einem Brunststoff, wird auf Grund eigener Versuche abgelehnt.

3. Es wird ein Weg beschrieben, um aus der Placenta Extrakte von hoher Wirksamkeit an der kastrierten Maus und am Kaninchen zu gewinnen. Das beste Präparat hat eine Reinheit von 0,1 bis 0,2 mg Trockensubstanz auf eine Mäuseeinheit. Es stellt ein gelbes, in Wasser unlösliches Öl dar. Ein endgültiger Schluß auf die Natur des Hormons ist daraus noch nicht zu ziehen.

4. Der Hormongehalt von 1 kg Placenta wird zu 500 bis 1000 M.-E. bestimmt.

---

[1]) a. a. O.

5. Das Feminin ist peroral und besonders perkutan gut wirksam.

6. Corpus luteum-Extrakte sind am Kaninchen wirksam. Die Extrakte von Hoden, Nebenhoden, Hühnereiern, Rinderleber, Gersten- und Weizenkeimlingen enthalten keine nachweisbaren Mengen von Feminin.

7. Auf die Sexualorgane von Männchen wirken große Dosen von unreinen Feminin-Extrakten zerstörend.

Einen Teil der Mittel für diese Arbeit verdanken wir dem Entgegenkommen der Deutschen Notgemeinschaft.

Beiträge zur Kenntnis des Mineralstoffhaushalts.

VI. Mitteilung[1]):

Über die Beeinflussung des normalen und veränderten Mineralstoffhaushalts des Kaninchens durch Radiumemanation.

Von

Emil Stransky.

(Aus dem pharmakologisch-pharmakognostischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 12. Juli 1926.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

I.

Die seinerzeit wohl vielfältig gehegte Hoffnung, in der Radioaktivität, im besonderen in dem Gehalt der Quellgase an radioaktiver Emanation, die bisher vergeblich gesuchte Erklärung für die trotz allem Skeptismus nicht hinwegzuleugnende therapeutische Wirksamkeit von Mineralquellen gefunden zu haben, mußte bald aufgegeben werden als sich zeigte, daß gerade therapeutisch besonders wichtige Heilquellen oft nur sehr wenig Radioaktivität besitzen.

Seither ist es zwar gelungen, im Tierexperiment andere Grundlagen für die therapeutische Wirksamkeit von Mineralquellen zu gewinnen, aber die Bedeutung der Radioaktivität blieb ein Problem. Eine Reihe von im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen ergab, daß durch Zufuhr von Mineralwasser der Mineralstoffhaushalt (M-S-H) der Säugetiere nicht nur überhaupt, sondern in einer ganz bestimmten, von der Zusammensetzung des gereichten Wassers abhängigen Art durch eine mehr oder minder langdauernde, regelmäßige Tränkung mit Mineralwasser verändert werden kann. Die mit derartigen Änderungen des M-S-H erfahrungsgemäß (siehe Einleitung zur V. Mitteilung, l. c.) einhergehenden Empfindlichkeitsänderungen des Organismus sind höchstwahrscheinlich die unmittelbaren Ursachen der Heilwirkungen von Mineralquellen.

[1]) V. Mitteilung: diese Zeitschr. 122, 1, 1921. Daselbst die vorhergehenden Mitteilungen angegeben.

Am Beispiel des Karlsbader Mineralwassers (KMW) und bisher nur an diesem, konnte demonstriert werden, daß neben diesen Änderungen des Kationen- und Anionenhaushalts Wirkungen auf verschiedene Organfunktionen als Folge der Mineralwasserzufuhr eintreten können [Sekretionssteigerung der Leber, Steigerung der Harnsäure eliminierenden Funktion der Niere[1])]. Vom Standpunkt der klassischen Pharmakologie aus betrachtet, erwies sich das KMW, das einzige bisher näher untersuchte Mineralwasser, somit auch als ein organotropes Pharmakon, und die Grundlagen seiner therapeutischen Wirkungen können daher sowohl durch direkte Beeinflussung gewisser Organfunktionen bedingt sein, als auch durch Beeinflussung der allgemeinen Krankheitsempfindlichkeit des Gesamtorganismus als Folge einer in bestimmter Richtung erfolgten Änderung seines M-S-H, wie dies kürzlich *Wiechowski*[2]) dargelegt hat.

Bei den Versuchen, die therapeutischen Wirkungen von Mineralquellen, insbesondere von Trinkkuren, aufzuklären, ist man also heute auch gar nicht genötigt, die Radioaktivität der Mineralquellen bzw. die Radiumemanation der Wässer und Quellgase mit heranzuziehen. Dies um so weniger, als alle bisher festgestellten Wirkungen auf den M-S-H ebenso wie die erwähnten organotropen Wirkungen mit Versandwässern hervorgerufen sind, deren Emanationsgehalt, wenn überhaupt vorhanden, nur ein ganz minimaler sein konnte.

Damit war aber nun keineswegs auch erwiesen, daß die radioaktive Emanation der Mineralquellen ganz bedeutungslos für die therapeutische Wirksamkeit sei. Im Gegenteil, die uralte Erfahrung, daß die Mineralquellen, am Orte ihres Ursprungs angewandt, therapeutisch wertvolleres zu leisten pflegen als die Versandwässer, konnte mit dem durch Verdampfen und Zerfallen beim Lagern zunehmenden Verschwinden der radioaktiven Emanation insofern in Zusammenhang gebracht werden, als diese Veränderung mit zu jenen gezählt werden muß, welche sich beim „Altern" in der ferneren Organisation der Mineralwässer vom Moment der Entnahme an der Quelle ab abspielen müssen. Schon früher hatte *Glenar* am Wasser von *Wichy* und später *Zörkendörfer* an den Franzensbader Eisenquellen die rasch verschwindenden der zunächst vorhandenen katalytischen Eigenschaften nach der Entnahme des Wassers von der Quelle festgestellt. Neuestens wurden von *Baudisch* und *Welo* Versuche mitgeteilt, welche die reaktionellen Unterschiede zwischen quellfrischem und gealtertem Wasser weiter ausdehnen und, soweit die Eisenquellen in Betracht kommen, das

---

[1]) *Stransky*, diese Zeitschr. **138**, 446, 1922; **143**, 433, 1923; **143**, 438, 1923; **155**, 256, 1925.

[2]) *Wiechowski*, Med. Klinik 1925, Nr. 39.

ungemein rasch eintretende Altern, das hier mit dem erst viel später beginnenden Verlust des Eisens durch Oxydation und Niederschlagsbildung nichts zu tun hat, nicht nur als eine Tatsächlichkeit zu erweisen, sondern auch sogar teilweise aufzuklären.

Wenn nun auch nach reaktionellen, insbesondere katalytischen Unterschieden, wie sie die genannten Forscher beobachteten und studiert haben, an dem von uns bearbeiteten Mineralwasser vorerst nicht gefahndet wurde, daher über ähnliche Alterserscheinungen nichts gesagt werden kann, und auch die von *Baudisch* und *Welo* festgestellten Veränderungen von uns keineswegs mit dem Verlust an Radioaktivität in Zusammenhang gebracht werden sollen, so muß doch anerkannt werden, daß die letztere unter jene Eigenschaften zu zählen ist, welche die Mineralwässer, ohne sinnfällige Veränderungen zu erleiden, nach Entströmen aus der Quelle rasch einbüßen. Es ergab sich daher für uns das Teilproblem, ob die am Versandwasser studierten Veränderungen des M-S-H durch gleichzeitige Darreichung von Radiumemanation eine Beeinflussung erfahren, ob demnach der Verlust an Radioaktivität unter Umständen mit verantwortlich gemacht werden kann, für die zwischen Versand- und Quellwasser bestehenden Unterschiede der therapeutischen Wirksamkeit.

Im Zuge der Mitteilungen über die Untersuchungen, welchen die vorliegende angehört, wurde bereits darauf hingewiesen, daß unter den uns zugänglichen Mineralwässern das KMW sich deshalb besonders zu experimentellen Studien eignet, weil sich seine chemische Zusammensetzung, seit überhaupt Analysen vorliegen, nicht verändert hat und weil zufolge der geologischen Situation und der Fassung der Quellen auch keine Wahrscheinlichkeit besteht, daß es zu Änderungen in der Zusammensetzung des Wassers kommen könnte. Diese Konstanz ist es, die das KMW zur Feststellung der Grundwirkungen von Mineralquellen überhaupt hervorragend geeignet macht. Ich habe daher die vorliegende Untersuchung über die Wirkung der Radiumemanation bzw. über deren Einfluß auf eine Mineralwasserwirkung am KMW studiert, über dessen Einzelwirkungen auf den M-S-H des tierischen Organismus wir durch die vorangegangenen Arbeiten bereits gut unterrichtet sind, wenn auch gerade beim KMW die Radioaktivität der Quellgase im Vergleich zu vielen anderen Mineralquellen eine recht untergeordnete Rolle spielt. Sie ist zwar größer als man sie in gewöhnlichen Quellwässern findet — so hat der Mühlbrunnen einen Gehalt von 31,5 Mache-Einheiten — aber gegenüber der der radioaktiven Wässern im engeren Sinne doch nur minimal.

Über die Beeinflussung des M-S-H durch Radiumemanation findet sich in der sonst überaus großen Radiumliteratur nur eine einzige

Arbeit vor. *Rosenbloom*[1]), dessen bezügliche Mitteilung leider im Original nicht zugänglich war, berichtet, daß bei einem Carcinomatösen nach lokaler Anwendung von Radium durch 4 Tage eine Retention von Calcium, Magnesium und Schwefel, sowie eine N-Retention festzustellen war. Der Einfluß der Radiumemanation auf den Gesamtstoffwechsel des Menschen und speziell auf den N-Stoffwechsel wurde an der *His*schen Klinik von *Staehelin* und *Maase*[2]) sowie von *Kaplan*[3]) mit dem Ergebnis untersucht, daß ein wesentlicher Einfluß nicht festzustellen war. Über die Beeinflussung des Purinstoffwechsels siehe später.

Das eigentliche Problem, das den mitzuteilenden Untersuchungen zugrunde liegt, nämlich festzustellen, ob die Radiumemanation imstande ist, die durch ihre chemische Zusammensetzung bestimmte pharmakologische Wirkung einer Mineralquelle auf den M-S-H zu beeinflussen, mußte naturgemäß auf der Basis von Untersuchungen studiert werden, welche ihrerseits eine Wirkung der Radiumemanation auf den M-S-H des mit Süßwasser getränkten tierischen Organismus feststellen sollten. Die vorliegenden Untersuchungen sind zum größeren Teil dieser Feststellung gewidmet. Die anschließenden Untersuchungen über die Beeinflussung der Mineralwasserwirkung durch Radiumemanation sind durch den Verlust eines Versuchstieres vorläufig als nicht abgeschlossen zu betrachten, wenn auch das Ergebnis dieses Teiles der Versuche den bisher gesammelten Erfahrungen in jeder Richtung entspricht, so daß die vorläufig gezogenen Schlüsse mit großer Wahrscheinlichkeit als richtig angesehen werden können.

Die Versuchsanordnung war prinzipiell die gleiche, wie sie in den vorangegangenen Untersuchungen dieser Reihe eingehalten worden war. Die Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten und ihnen ausschließlich Hafer ad libitum als Nahrung gereicht. Alle verwendeten Tiere wurden zuerst in einer drei- bis viertägigen Gewöhnungsperiode auf ihre Eignung untersucht, was erfahrungsgemäß notwendig ist, da die aus dem Stall in die Glasglocken, welche als Stoffwechselkäfige dienten, gebrachten Tiere bei der an sich unzweckmäßigen, reinen Haferdiät mit Leitungswasser in den ersten Tagen wenig fressen und Gewichtsverluste erleiden. Manche Tiere erweisen sich durch eine dauernde Gewichtsabnahme als ungeeignet zu derartigen Versuchen und müssen durch andere ersetzt werden. Es wurden also nur Kaninchen verwendet, welche den dauernden Aufenthalt im Stoffwechselkäfig und insbesondere das einseitige Haferregime ausreichend gut vertragen. Hinsichtlich der Einzelheiten der Versuchsanordnung verweise ich auf die früheren

---

[1]) *Rosenbloom*, Journ. of metabolic Res. 4, 75, 1923; zitiert nach Chem. Centralbl. 1924, II, 1602.

[2]) *Staehelin* und *Maase*, Veröff. Zentralbl. f. Balneol. 1912, Heft 10.

[3]) *Kaplan*, ebendaselbst 1912, Heft 8.

Mitteilungen. Nach der erwähnten Gewöhnungsperiode wurde an zwei Tieren in einer achttägigen Normalperiode der Mineralstoffhaushalt durch Analyse der gesamten Ein- und Ausgaben auf K, Na, Ca, Mg und die Anionen Cl und Phosphat bestimmt. Die Begründung dieser Art, den M-S-H zu studieren ist des näheren ausgeführt in den früheren Mitteilungen, l. c., und bei *Wiechowski*[1]). In der unmittelbar anschließenden Hauptperiode von ebenfalls 8 Tagen wurden unter Einhaltung der gleichen äußeren Versuchsbedingungen zweimal täglich gemessene Mengen von Radiumemanation in Leitungswasser zugeführt, welche täglich aus einer Radiumbromidlösung in das Leitungswasser übergepumpt wurde[2]). Um Verluste an Emanation tunlichst zu vermeiden, wurde das Emanationswasser nicht in die Tränkschalen gegossen, sondern zweimal täglich zu je 50 ccm mit der Schlundsonde eingeführt, und deshalb wurde auch in der Normalperiode das Tränkwasser zweimal täglich in der gleichen Menge mit der Schlundsonde gegeben, um alle Versuchsbedingungen in beiden Perioden gleich zu gestalten. Es wurden täglich Emanationsmengen im Betrage von 0,91 bis 1,48 elektrostatische Einheiten (ESE) gereicht, im ganzen innerhalb 8 Tagen 8,61 ESE, und zwar beiden Tieren die gleiche Menge. Diese Emanationsmengen sind allerdings bei weitem größer als sie jemals beim Trinken natürlicher radioaktiver Wässer aufgenommen werden, würde doch, die gereichte Emanationsmenge in den für Quellaktivität gewöhnlich benutzten Mache-Einheiten ausgedrückt, dem Quellwasser einer Aktivität von 10000 bis 15000 Mache-Einheiten entsprechen. Doch dürfte sich hieraus kein Einwand gegen die Gültigkeit der Versuchsergebnisse für Trinkkuren ergeben, da durch Einatmen der Quellgase anläßlich solcher Kuren weitaus größere Emanationsmengen dem Organismus zugeführt werden, als durch das Trinken der radioaktiven Quellwässer. So werden beim Aufenthalt an selbst nur wenig Emanation enthaltenden Quellen tatsächlich große Emanationsmengen zur Wirkung gelangen können.

Die folgenden Tabellen zeigen die Bilanzen der zwei untersuchten Tiere, ausgedrückt in Milligrammäquivalenten der untersuchten Ionen. Die der Einnahmen und Ausgaben an Kationen sind außerdem in Äquivalentprozente umgerechnet und nach dem zuerst bei *Luithlen*[3]) angewandten Prinzip graphisch dargestellt worden. Zugehörige analytische Angaben finden sich im experimentellen Teile.

---

[1]) *Wiechowski*, Referat in Verhandl. d. Deutsch. Ges. f. inn. Med. 1924, S. 6 bis 17.

[2]) Das Radiumpräparat verdanken wir dem besonderen Entgegenkommen des Herrn Dr. *Alois Fischer*-Wien, der uns eine Radiumbromidlösung ausreichender Aktivität zur Emanationsentnahme für beliebige Zeit anvertraut hat, wofür ihm auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

[3]) *Luithlen*, Arch. f. exper. Pathol. 69, 365, 1912.

Die Wirkung der zugeführten Emanationsmengen war in beiden Fällen die gleiche, und zwar nicht nur im allgemeinen Charakter, in der Richtung, sondern auch in den Einzelheiten. In der *Normal*periode bei ausschließlicher Haferdiät und Leitungswasser trat eine beträchtliche Demineralisation ein, welche in beiden Fällen zu einem geringen Gewichtsverlust führte, eine Erscheinung, die nach unseren Erfahrungen bei diesem Ernährungsregime fast stets festzustellen ist. Die Demineralisation äußert sich insbesondere in der Kationenbilanz. Der Gesamtverlust an Kationen betrug bei Tier Nr. 12 rund 12 Milligrammäquivalente (mg-Äqu.), bei Tier Nr. 14 rund 42 mg-Äqu. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von *Sgalitzer*[1]) überein, jedoch sind hier die Verluste nicht so beträchtlich, offenbar, weil hier Leitungswasser gereicht wurde, bei seinen Versuchen jedoch destilliertes Wasser. Auch der deutliche Phosphatverlust des Tieres Nr. 14 entspricht

Tabelle I.

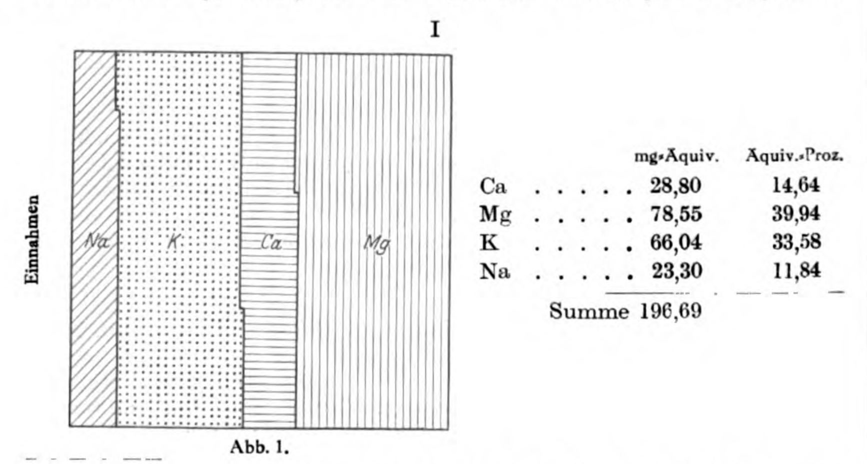
Kaninchen Nr. 14. I. Achttägige Vorperiode bei Hafer und Leitungswasser. II. Achttägige Hauptperiode bei Hafer und Leitungwasser mit Radiumemanation. Bilanzen der Anionen und Kationen in mg-Äquivalenten:

	I	II		I	II
Ca	— 51,69	— 19,76			
Mg	+ 11,32	+ 11,35			
K	— 4,91	— 0,05	Cl	— 3,70	+ 0,57
Na	+ 2,90	+ 1,95	$H_4(PO_4)_3$	— 22,80	+ 8,12
Summe	— 42,38	— 6,51	Summe	— 26,50	+ 8,69

Bilanz der Bilanzen:

I 15,88 mg-Äquivalente Kationen mehr als Anionen verloren.
II 15,20 „ „ Anionen mehr als (tatsächl. verlor.) Kationen angesetzt.

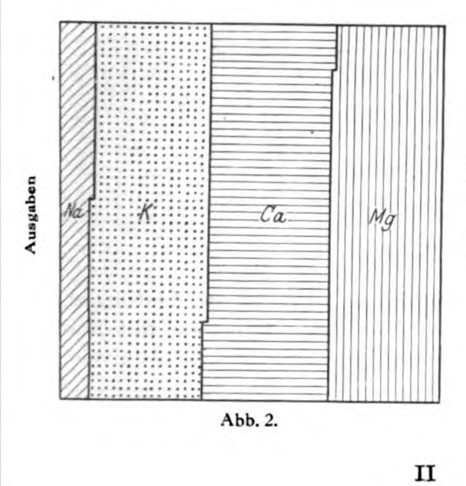
Die Kationen der gesamten Einnahmen und Ausgaben in mg-Äquivalenten und Äquivalentprozenten ausgedrückt und graphisch dargestellt:



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	28,80	14,64
Mg	78,55	39,94
K	66,04	33,58
Na	23,30	11,84
Summe	196,69	

Abb. 1.

[1]) *Sgalitzer*, II. Mitteilung dieser Reihe, Zeitschr. f. Balneol. 7, 1, 1914.



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	80,49	29,68
Mg	67,23	28,12
K	70,95	29,68
Na	20,40	8,53
Summe	239,07	

Abb. 2.

II

Einnahmen

	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	25,49	14,83
Mg	68,48	39,83
K	57,53	33,48
Na	20,41	11,86
Summe	171,91	

Abb. 3.

Ausgaben

	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	45,25	25,36
Mg	57,13	32,02
K	57,58	32,27
Na	18,46	10,35
Summe	178,42	

Abb. 4.

Verteilung der Ca-Ausscheidung.

	Harn Proz.	Kot Proz.
I	27,75	72,25
II	22,59	77,41

Tabelle II.

Kaninchen Nr. 12. I. Achttägige Vorperiode bei Hafer und Leitungswasser. II. Achttägige Hauptperiode bei Hafer und Leitungswasser mit Radiumemanation. Bilanzen der Anionen und Kationen in mg-Äquivalenten:

	I	II		I	II
Ca	— 9,31	— 1,03			
Mg	+ 9,51	+ 10,49			
K	— 2,00	— 2,74	Cl	— 4,62	— 0,31
Na	— 10,13	— 3,00	$H_4(PO_4)_3$ . . .	+ 1,46	+ 6,28
Summe	— 11,93	+ 3,72	Summe	— 3,16	+ 5,97

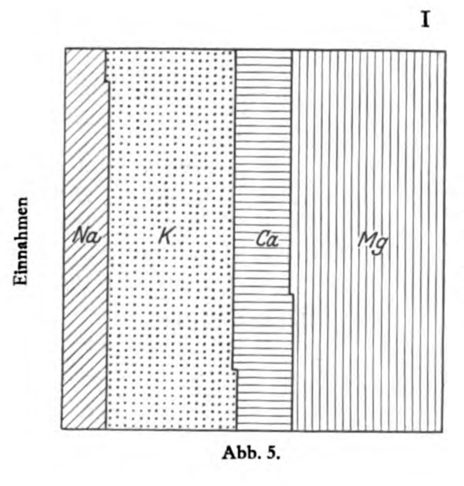
Bilanz der Bilanzen:

I 9,77 mg-Äquivalente Kationen mehr als Anionen verloren.

II 2,25 „ „ Anionen mehr als Kationen angesetzt.

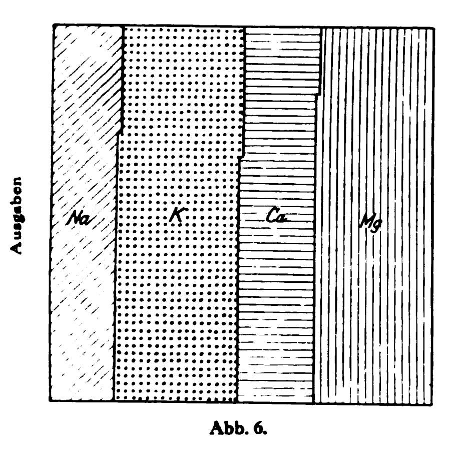
Die Kationen der gesamten Einnahmen und Ausgaben in mg-Äquivalenten und Äquivalentprozenten ausgedrückt und graphisch dargestellt:

I



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	21,05	15,19
Mg	54,95	39,64
K	46,09	33,25
Na	16,53	11,92
Summe	138,62	

Abb. 5.



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	30,36	20,17
Mg	45,44	30,18
K	48,09	31,94
Na	26,66	17,71
Summe	150,55	

Abb. 6.

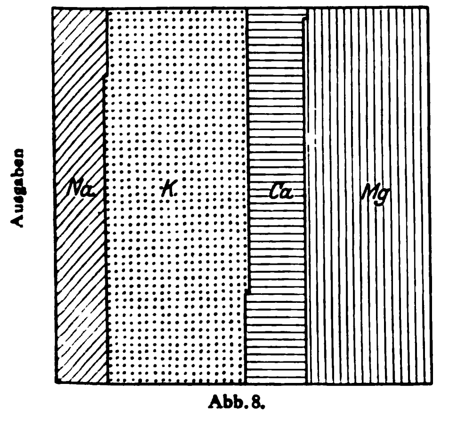
II

Einnahmen

Na K Ca Mg

	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	19,11	15,41
Mg	49,02	39,52
K	41,08	33,12
Na	14,83	11,95
Summe	124,04	

Abb. 7.



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	20,14	16,74
Mg	38,53	32,02
K	43,82	36,42
Na	17,83	14,82
Summe	120,32	

Abb. 8.

Verteilung der Ca-Ausscheidung:

	Harn Proz.	Kot Proz.
I	52,44	47,56
II	44,64	55,36

der Erfahrung, bei Hafertieren, welche ich l. c. mitgeteilt habe. Das Tier Nr. 12 zeigte aber eine schwach positive Phosphatbilanz. Die Cl-Werte brauchen wegen der geringen physiologischen Bedeutung kleiner Schwankungen hier nicht näher diskutiert zu werden.

Auch in den Einzelheiten der Kationenbilanzen ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung des Verhaltens beider Tiere mit den Versuchsergebnissen von *Sgalitzer*. An dem beträchtlichen Gesamtverluste an Kationen ist besonders Ca beteiligt. Die Teilbilanzen der übrigen Kationen zeigen, wenn man alle über den Einfluß reiner Haferkost vorliegenden Versuche in Betracht zieht, ein weit weniger charakteristisches und übereinstimmendes Verhalten im einzelnen. Beim Vergleich der Äquivalentprozenttabellen der Einnahmen und Ausgaben, insbesondere beim Vergleich der bezüglich graphischen Darstellungen, wobei die Gleichgewichtsverschiebungen aufs deutlichste sichtbar werden, ergibt sich bei allen, sowohl den Tieren *Sgalitzers*, als auch den beiden jetzt von mir untersuchten, die gleiche *relative* Anreicherung an Alkalikationen und Mg auf Kosten des Ca. Die Normalperiode zeigt daher in toto und in ihren Einzelergebnissen eine erfreuliche Übereinstimmung mit den bisherigen sich auf einen Zeitraum von mehr als 15 Jahren erstreckenden Erfahrungen und gibt damit eine gesicherte Grundlage für die Beurteilung der Emanationswirkung in der Hauptperiode.

Wie bereits erwähnt, haben beide Tiere infolge der unzweckmäßigen Nahrung in der Normalperiode Gewichtsverluste erlitten, Tier Nr. 12 einen solchen von 130 g. Bei diesem Tiere setzte sich der Verlust, allerdings in verlangsamtem Tempo auch in der Hauptperiode fort, es verlor dann noch 80 g. Bei Tier Nr. 14 betrug die Gewichtsabnahme in der Normalperiode 125 g. Sie wurde in der Hauptperiode nicht nur sistiert, sondern das Tier konnte noch 20 g seines Verlustes wieder hereinbringen. Es hat also den Anschein, als ob die Radiumemanation dem durch das Ernährungsregime bedingten Gewichtsverlust bis zu einem gewissen Grade entgegengewirkt hätte. Mit diesem Ergebnis stehen durchaus im Einklang das Verhalten der Ionenbilanzen in den beiden Versuchsperioden: einem Gesamtkationenverlust von 42 mg-Äqu. in der Normalperiode steht ein solcher von bloß 6,5 mg-Äqu. in der Hauptperiode bei Kaninchen Nr. 14 gegenüber, also eine ganz erhebliche Minderung der Demineralisation bzw. eine deutliche Verlangsamung ihres weiteren Fortschreitens. Bei Kaninchen Nr. 12, welches offensichtlich das Haferregime besser vertragen hatte, schlug die in der Normalperiode mit fast 12 mg-Äqu. negative Kationenbilanz in der Hauptperiode gar in eine positive um. Das Tier hat in der Emanationsperiode fast 4 mg-Äqu. Kationen angesetzt.

Einem Gewichtsgewinn von 20 g steht — wenn auch ihr Vorzeichen noch negativ geblieben ist — eine Besserung der Kationenbilanz um 35,5 mg-Äqu. bei Tier Nr. 14 gegenüber; mit einer Verlangsamung der Gewichtsabnahme bei Tier Nr. 12 geht ein Gewinn von im ganzen 16 mg-Äqu. einher, wobei das Vorzeichen der Bilanz positiv wird. Die Änderung des

M-S-H liegt also bei beiden Tieren in der Richtung einer Einsparung mineralischer Substanz. Dem entspricht auch das Verhalten der Phosphatbilanzen, welche ebenfalls bei beiden Tieren gleichsinnig einen Ansatz anzeigen: die bei Tier Nr. 12 schon in der Normalperiode mit 1,5 mg-Äqu. allerdings sehr geringfügig positive Phosphatbilanz erhebt sich auf über + 6 mg-Äqu. Viel beträchtlicher ist die Änderung bei Tier Nr. 14, das auch einen größeren Kationengewinn erzielt hat: die in der Normalperiode mit 26,5 mg-Äqu. stark negative Phosphatbilanz wurde mit fast 9 mg-Äqu. positiv, was eine ganz beträchtliche Restitution des Mineralstoffbestandes bedeutet.

Es hat also in beiden Fällen übereinstimmend die Radiumemanation im Sinne einer Mineralisation unter Ansatz von Phosphorsäure gewirkt.

Sehr interessant sind in diesen Versuchen die Vergleiche der korrespondierenden Anionen- und Kationenbilanzen, die hier zum ersten Male an einem und demselben Tiere gezogen werden konnten. In der vorangegangenen V. Mitteilung, l. c., und dem Referate *Wiechowskis*, l. c., über den M-S-H ist die Beschränkung auf das Chlorid- und Phosphation bei der Beurteilung des M-S-H näher begründet worden, insbesondere die Nichteinbeziehung des Hydrocarbonations, welches zum großen Teile, wenn nicht ausschließlich seine Entstehung dem organischen Stoffwechsel verdankt. Vergleicht man nun die Anionenbilanzen mit den zugehörigen Kationenbilanzen der Normalperioden beider Tiere, so ergibt sich ein beträchtlicher, sozusagen ungedeckter Überschuß an Kationen: beide Bilanzen sind negativ, aber die Kationenbilanzen weit mehr als die Anionenbilanzen. Das entspricht durchaus den Schlüssen, die aus meinen Versuchen über das Verhalten der Anionen und denen *Sgalitzers* über das Verhalten der Kationen, sowohl bei Tränkung mit KMW als mit Leitungs- und destilliertem Wasser (allemal unter Haferernährung) gezogen worden sind: sowohl bei der Mineralisation als bei Demineralisation sind die Veränderungen im Kationenhaushalt weit erheblicher als die im Anionenhaushalt, es gehen mehr Kationen zu Verlust als Anionen und es werden andererseits mehr Kationen angesetzt als Anionen. Die oft erhebliche Anzahl fehlender Anionenäquivalente kann man sich nur durch Hydrocarbonat oder aber Eiweißkörper gedeckt denken, wenn nicht etwa noch unbekannte organische Säuren intervenieren. Die bisher bekannten organischen Säuren der Ausscheidungen kommen jedenfalls wegen ihrer Geringfügigkeit zur Deckung eines erheblicheren Defizits nicht in Betracht. Der gleiche unerwartete Befund soll bei der Analyse des Blutes auf anorganische Substanzen erhoben worden sein, wobei ebenfalls ein Defizit an Anionenäquivalenten gefunden worden ist.

Der Bilanzüberschuß an Kationen muß bei einer Mineralisation zu einem Überwiegen der Basenäquivalente und bei einer Demineralisation zu einem Überwiegen der Säureäquivalente im Organismus führen. Die hieraus zu deduzierende Acidose bzw. Alkalose könnte sich naturgemäß bloß in dem Verhalten der Alkalireserve des Blutes eventuell in der Ammoniakausscheidung im Harn geltend machen. In der Tat ist von *Arnoldi* und *Roubitschek*[1]) mitgeteilt worden, daß beim Trinken von KMW eine bestehende Verminderung der Alkalireserve des Blutes der Norm zugeführt wird. Aber auch der Schluß, daß eine Demineralisation mit einer Veränderung des Organismus nach der Seite der Acidose verknüpft sei, dürfte zufolge der allerdings spärlichen Befunde über das Verhalten des

---

[1]) *Arnoldi* und *Roubitschek*, Deutsch. med. Wochenschr. 48, 250, 1922.

M-S-H des Menschen den Erfahrungen entsprechen. Das Eintreten solcher Veränderungen, Alkalose und Acidose, muß aber nicht notwendig die Folge des entsprechenden, gesetzmäßigen Verhaltens sein, insofern sich die in den Bilanzen zum Ausdruck kommenden Veränderungen im M-S-H in Depots abspielen können, in welchen die Kationen ohne anorganische Säureäquivalente etwa an Eiweiß usw. gebunden sind. Da aber schließlich in allen bisherigen Versuchen sich die entsprechenden Bilanzveränderungen am Phosphation abspielen, besteht die Möglichkeit, daß die Bilanzunterschiede ganz ohne Einfluß auf den Alkalibestand des Organismus bleiben, insofern, als das Phosphation nur zu einem geringen Teil als solches, zu einem weitaus größeren in Esterbindung vorhanden ist oder in solche übergehen kann (Lactacidogen, Nucleinsäuren) und auf diese Weise für die Ionenbilanz je nach Bedarf ausscheiden kann.

Jedenfalls macht sich das sozusagen gesetzmäßige Verhalten des Überwiegens der Kationen bei Veränderungen des M-S-H auch in den Normalperioden der beiden vorliegenden Versuche geltend: bei einer negativen Bilanz beider Ionengruppen ist die zu Verlust gegangene Summe der Anionen wesentlich geringer als die Summe der gleichzeitig abgegebenen Kationen. Der Unterschied beträgt bei Tier Nr. 14 fast 16 Säureäquivalente, bei Tier Nr. 12 fast neun Säureäquivalente. Es mag schon hier darauf hingewiesen sein, daß sich in dem Versuche mit KMW, bei der in der Normalperiode durch dieses hervorgerufenen beträchtlichen Mineralisation das gleiche Verhalten gezeigt hat, einem ganz kolossalen Ansatz von Kationen entspricht nur eine geringe gleichzeitige Zunahme an Anionen, so daß die enorme Menge von 59 mg-Äqu. angesetzter Kationen keine entsprechende anorganische Deckung findet.

Unter dem Einflusse der Radiumemanation ergab sich nun eine vollkommene Umkehr dieses gegenseitigen Verhaltens der Kationen und Anionen. In der Hauptperiode, in der die Emanation gereicht worden war, ergeben die Bilanzen beider Versuchstiere übereinstimmend einen beträchtlichen Überschuß an Anionenäquivalenten, während die Veränderungen im Kationengehalt in den Hintergrund treten. Besonders deutlich tritt dieses Verhalten bei Tier Nr. 14 zutage, indem einem Ansatz von 8,7 mg-Äqu. Anionen ein noch übrig gebliebener Verlust von 6,5 mg-Äqu. Kationen gegenübersteht, so daß mehr als 15 mg-Äqu. Anionen rechnerisch ungedeckt erscheinen. Bei dem Tier Nr. 12, dessen vordem negative Kationenbilanz in der Hauptperiode schwach positiv geworden war, steht einem Zuwachs von 3,7 mg-Äqu. Kationen ein solcher von 6 mg-Äqu. Anionen gegenüber. Ich glaube nicht, daß es sich hier um einen Zufall handelt, da einerseits beide Versuche durchaus in der gleichen Richtung verlaufen und andererseits sich bei dem nun zu besprechenden Versuche über den Einfluß der Ra-Emanation auf die Wirkung des KMW ein prinzipiell gleiches Verhalten feststellen ließ, also sowohl im Zustande der Mineralisation des tierischen Organismus als auch bei Demineralisation. Einerlei, wie der de norma bestehende Unterschied zwischen den Kationen- und Anionenbilanzen in Zukunft wird erklärt werden, jedenfalls scheint hier eine ganz auffällige, wichtige Wirkung der Radiumemanation vorzuliegen, denn eine Veränderung im gesetzmäßigen Verhältnis der sauren zu den basischen Bestandteilen des M-S-H muß zweifellos von erheblichen sekundären Wirkungen auf den Organismus gefolgt sein.

In beiden Normalperioden sind mehr Kationen zu Verlust gegangen als Anionen, woraus sich eine Veränderung im Sinne einer Acidosis ergeben

würde, in beiden Hauptperioden ergab sich ein wesentlicher Anionenansatz gegenüber einem geringeren Kationenansatz bzw. einem noch zurückgebliebenen geringen Kationenverlust, also ebenfalls eine Änderung im Sinne einer Acidose. Die Differenz, welche zwischen Anionen und Kationen besteht, beträgt, wenn man unter Berücksichtigung des Vorzeichens der Bilanzen die Anionenäquivalente von den Kationenäquivalenten abzieht, bei Tier Nr. 14 in der Vorperiode 16 Kationenäquivalente, die mehr zu Verlust gegangen sind, und 15 Kationenäquivalente in der Hauptperiode, die weniger angesetzt worden sind. Bei Tier Nr. 12 wurden in der Normalperiode 8,1 Kationenäquivalente mehr verloren und in der Hauptperiode 2,25 Kationenäquivalente weniger angesetzt.

Fassen wir die Ergebnisse der beiden Versuche zusammen, so ergibt sich übereinstimmend ein nicht unerheblicher Einfluß der allerdings in beträchtlichen Mengen gereichten Radiumemanation auf den M-S-H der Kaninchen. Die Richtung dieser Beeinflussung geht dahin, daß der Organismus befähigt wird, seine mineralischen Substanzen zu sparen: es kommt beim Bestehen einer Demineralisation zu einer erheblichen Verminderung der dauernden mineralischen Substanzverluste, die beim Bestehen einer geringgradigeren Unterbilanz sogar zu einem Ansatz mineralischer Substanz führen kann. Mit dieser Einsparung von Mineralsubstanzen geht infolge des erwähnten, eigentümlichen gegensätzlichen Verhaltens der Kationen und Anionen eine Verminderung einer durch den Zustand der Demineralisation bedingten Säuerung des Organismus einher. Doch wird diese Teilwirkung wenigstens bis zu einem gewissen Grade dadurch wettgemacht, daß unter der Emanationswirkung insbesonders das Phosphation in viel erheblicherem Maße eingespart wird, so daß in direktem Gegensatz zur Norm beim Ansatz die Anionen überwiegen, woraus für sich allein eine Zunahme der Säuerung zu schließen wäre. Entsprechend den obigen Ausführungen dürfte aber insbesondere die Einsparung des Phosphations, welche gerade hier die Anionenbilanz beherrscht, zurückzuführen sein auf eine Verwertung für die lebenswichtigen Ester, und daher aus diesem Titel eine Minderung der Veränderung nach der alkalischen Seite hin in der Emanationsperiode nicht zu erwarten sein.

Im allgemeinen ergibt sich als Emanationswirkung eine erhebliche Retention von Ca und Phosphat, wobei der Einfluß auf beide einander nahezu gleichkommt. Während im Zustande der durch das einseitige Haferregime bedingten Demineralisation die Tiere relativ an Ca ärmer, an Mg reicher wurden, ändert sich unter dem Einfluß der Emanation dieses gegenseitige Verhältnis vollkommen, es kommt zu einer relativen Ca-Anreicherung und Mg-Verarmung des Organismus. Eine Verbesserung der Kationenbilanzen im Sinne einer Anreicherung und insbesondere einer Ca-Anreicherung wurde von *Sgalitzer*, l. c., seinerzeit als Wirkung des MKW festgestellt, eine damit einhergehende Anreicherung mit Phosphaten haben meine eigenen Untersuchungen, l. c., erwiesen. Die

Richtung der Einflußnahme auf den M-S-H liegt also bei beiden gleich, nur ist die Wirkung des KMW auf den Kationenansatz eine weitaus beträchtlichere, was ja bei der dadurch erfolgten Zufuhr erheblicher Salzmengen verständlich erscheint. Dagegen ist die indirekte Wirkung des KMW auf den Phosphathaushalt wesentlich geringer als in den vorliegenden Versuchen die Wirkung der Radiumemanation auf die Phosphatbilanz. Man muß diese Teilwirkung der Radiumemanation geradezu als die hervorstechendste bezeichnen, sie äußert sich nicht nur in der absoluten Größe der Phosphatbilanz, sondern auch darin, daß die Veränderung an den Anionen, von denen das Phosphat den weitaus größten Teil ausmacht, sogar die an den Kationen übertrifft, ein Verhalten, das bis jetzt noch niemals beobachtet worden ist. Auf die überragende physiologische Bedeutung des Phosphations wurde schon in meiner letzten Mitteilung hingewiesen und die Verbesserung der Phosphatbilanz unter dem Regime des KMW als eine Ursache der an den Tieren beobachteten wesentlichen Verbesserung ihres Allgemeinzustandes betrachtet. Der Radiumemanation kommt nun diese Teilwirkung in noch höherem Maße zu und es fordern die mitgeteilten Zahlen dazu auf, therapeutische Versuche mit Radiumemanation bei pathologischen Zuständen anzustellen, zu deren charakteristischen Symptomen eine vermehrte Phosphatausscheidung gehört, etwa wie sie *Tessier*[1]) bei seinem diabète phosphaturique oder *Moll*[2]) bei ernährungsgestörten Säuglingen gefunden hat. Wir sind gewöhnt, die Wirkung der Radiumemanation, wie die der strahlenden Energie überhaupt, in einem Zerfall der Nucleoproteide der Zellen, insbesondere der Zellkerne zu sehen, woraus sich unter anderem eine vermehrte Ausscheidung der Purinstoffe, Harnsäure bzw. Allantoin ergibt [*Starkenstein*[3])]. Bei dem Zerfall der Nucleinsäuren müssen auch Phosphate frei werden, und es wäre daher eher das Gegenteil, eine vermehrte Phosphatausscheidung zu erwarten gewesen. Da aber die Phosphorsäure im Organismus verwendet werden kann, einerlei, ob sie von außen zugeführt oder in ihm frei geworden ist, so ist aus einer Vermehrung der Ausscheidung kein Schluß möglich auf entsprechende Vermehrung der Bildung und umgekehrt.

In qualitativer Beziehung, im allgemeinen und in den Einzelheiten ist also die Änderung des M-S-H durch Radiumemanation der durch KMW ähnlich, unterscheidet sich jedoch von ihr dadurch, daß bei ihrer Wirkung die Änderung des Anionenhaushalts in den Vordergrund tritt, während beim KMW die stärkere Beeinflussung auf dem Gebiete der Kationen liegt.

[1]) *Tessier*, Le diabète phosphaturique. Paris 1876.
[2]) *Moll*, Jahrb. f. Kinderh. **69**, 129, ff.
[3]) *Starkenstein*, diese Zeitschr. **106**, 139, 1920.

Die Ähnlichkeit der beiden Wirkungen bezieht sich auch auf die Verteilung der Ca-Ausscheidung auf Harn und Kot. Normalerweise überwiegt die Ausscheidung im Kot bei weitem die im Harn. Von dieser Regel macht nur das Tier Nr. 12 eine Ausnahme, bei welchem in der Normalperiode die Ca-Ausscheidung sich auf Harn und Kot ziemlich gleichmäßig verteilt hat, ja sogar die Harnausscheidung ein wenig überwiegt. Bei beiden Tieren zeigt nun das Ca die Neigung, unter dem Einfluß der Radiumemanation noch mehr im Darm ausgeschieden zu werden. Auch diese Teilwirkung, die auf die Verteilung der Ca-Ausfuhr, ist einer des KMW gleichartig.

II.

In Anbetracht der weitgehend gleichsinnigen Beeinflussung des M-S-H durch Radiumemanation und durch KMW mußte die Untersuchung der Wirkung der Emanation auf den durch das Mineralwasser geänderten M-S-H von besonderem Interesse sein. Leider mußte das eine der beiden mit KMW getränkten Versuchstiere ausgeschaltet werden, weil es trotz gut überstandener Gewöhnungsperiode nicht fraß und durch dauernde Gewichtsabnahme in der Vorperiode sich als ungeeignet erwiesen hat. Trotzdem scheint mir die Möglichkeit gegeben, aus den bei dem verbliebenen einzigen Tiere erhobenen Befunden sichere Schlüsse zu ziehen, denn das bei diesem Tiere beobachtete allgemeine Verhalten sowie das seines M-S-H steht durchaus im Einklang mit unseren bisher gemachten vielfachen Erfahrungen über die Wirkungen des KMW, und andererseits sind die Wirkungen der Radiumemanation, welche zur Beobachtung kamen, durchaus in der gleichen Richtung gelegen, wie die bei den eben besprochenen zwei Tieren.

Der Versuch wurde unter genauer Einhaltung derselben Bedingungen ausgeführt, wie sie bei den schon besprochenen Tieren angewandt worden waren. Das Tier Nr. 46 erhielt in der 8 Tage währenden Vorperiode (nach Absolvierung einer viertägigen Gewöhnungsperiode) bei reiner Haferdiät zweimal täglich je 50 ccm KMW mit der Schlundsonde zugeführt, und zwar KMW von Zimmertemperatur aus Versandflaschen. In der unmittelbar anschließenden Hauptperiode wurde das KMW mit Radiumemanation von ungefähr der gleichen Menge, wie bei den beiden bereits besprochenen Versuchen mit Leitungswasser, zugeführt. Das Tier erhielt im Durchschnitt pro die 1,5 bis 1,8 ESE, im ganzen 13,4 ESE in einer Konzentration, die einem Quellwasser von 15000 bis 18000 Mache-Einheiten entsprechen würde. Bei diesem Tier ging eine Periode mit Leitungswasser nicht voran, sondern die Periode, in der KMW allein ohne Radiumemanation gegeben worden war, gilt als Vorperiode im Vergleich zu der dann folgenden Hauptperiode mit Radiumemanation. Die nun folgenden Tabellen und graphischen Darstellungen geben die Versuchsergebnisse der zwei Perioden nach dem gleichen Prinzip der Darstellung wie oben wieder.

Tabelle III.

Kaninchen Nr. 46. I. Achttägige Vorperiode bei Hafer und Karlsbader Mineralwasser. II. Achttägige Hauptperiode bei Hafer und Karlsbader Mineralwasser mit Radiumemanation. Bilanzen der Anionen und Kationen in mg-Äquivalenten.

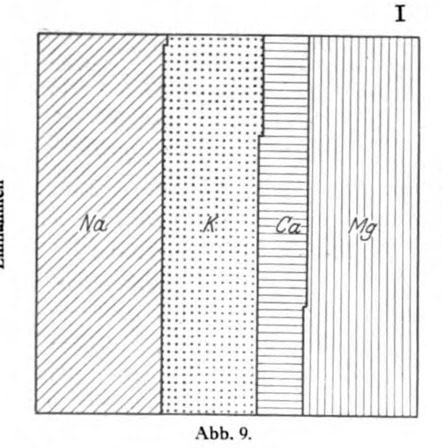
	I	II		I	II
Ca	— 5,83	+ 7,96			
Mg	+ 15,19	+ 17,22	Cl	+ 7,90	+ 9,47
K	+ 7,73	+ 14,24	$H_4(PO_4)_3$	— 3,70	+ 35,12
Na	+ 46,17	+ 30,23	SO_4	+ 2,85	+ 2,95
Summe	+ 63,26	+ 69,65	Summe	+ 7,05	+ 47,54

Bilanz der Bilanzen:

I 56,51 mg-Äquivalente Kationen mehr als Anionen angesetzt,
II 22,11 „ „ „ „ „ „ „

Die Kationen der gesamten Einnahmen und Ausgaben in mg-Äquivalenten und Äquivalentprozenten ausgedrückt und graphisch dargestellt:

I



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	27,09	11,56
Mg	69,58	29,71
K	57,97	24,75
Na	79,59	33,98
Summe	234,23	

Abb. 9.

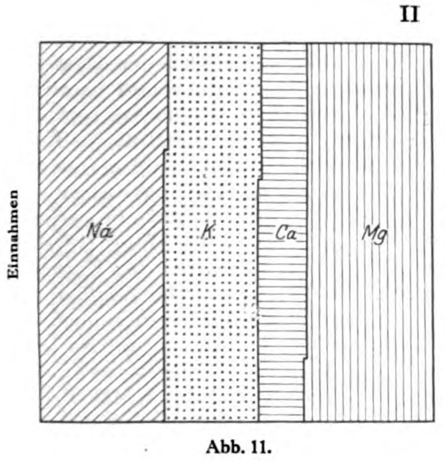
Ausgaben

Na K Ca Mg

	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	32,92	19,24
Mg	54,39	31,84
K	50,24	29,41
Na	33,30	19,51
Summe	170,85	

Abb. 10.

II



	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	27,45	11,53
Mg	70,70	29,83
K	58,92	24,92
Na	79,91	33,72
Summe	236,98	

Abb. 11.

	mg-Äquiv.	Äquiv.-Proz.
Ca	19,49	11,70
Mg	53,48	32,07
K	44,68	26,80
Na	49,08	29,43
Summe	166,73	

Abb. 12.

Verteilung der Ca-Ausscheidung:

	Harn Proz.	Kot Proz.
I	22,40	77,60
II	2,90	97,10

In der Vorperiode fand eine ganz erhebliche Mineralisation statt, an der sich insbesonders das Natrium beteiligt hat, die Ca-Bilanz ist mit 5,8 mg-Äqu. schwach negativ, viel schwächer negativ, als sie sonst bei Hafertieren zu sein pflegt. Auch in *Sgalitzers* Versuchen, l. c., konnte der bei seinen Tieren in der Vorperiode besonders ausgeprägte Ca-Verlust durch ein 14tägies Regime mit KMW nicht ganz beseitigt, sondern nur wesentlich verringert werden. Aber gerade dieses Detail ist für das Merkbarwerden der Emanationswirkung günstig gewesen: in der Hauptperiode setzte das

Tier Calcium in der Menge von fast 8 mg-Äqu. an. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, hat das Tier in der Vorperiode über 63 mg-Äqu. Kationen angesetzt, und diesem Ansatz entspricht auch ein deutlicher Gewichtszuwachs, welcher im Vergleich zu der ebenso ausgesprochenen Gewichtsabnahme der mit Leitungswasser getränkten Tiere wieder so recht die Förderung des Allgemeinbefindens der Tiere unter dem Einfluß des KMW dartut. Dies wird um so deutlicher, wenn man die gleichzeitig gefressenen Hafermengen mit berücksichtigt: Tier Nr. 14 hat bei Leitungswasser 700 g Hafer aufgenommen und dabei in 8 Tagen 125 g an Körpergewicht verloren, das KMW-Tier Nr. 46 hat in derselben Zeit bei KMW 600 g Hafer gefressen und 30 g an Körpergewicht gewonnen. In den Einzelheiten der Kationenwirkung des KMW fand sich gegenüber den Versuchen von *Sgalitzer* nur ein Unterschied bei den Alkalikationen: während *Sgalitzer* in seinen Versuchen durchgehends einen weit größeren Ansatz von K als von Na beobachtet hat, ist im vorliegenden Versuche der Na-Ansatz der weitaus größere. Doch sind *Sgalitzers* Tiere unter anderen Bedingungen in das KMW-Regime eingetreten als dieses Tier. Die Phosphatbilanz des vorliegenden Versuchs steht durchaus im Einklang mit meinen eigenen früheren Versuchen, bei denen die vorher stark negative Phosphatbilanz schwach negativ oder schwach positiv geworden war, die diesmal mit 3,7 mg-Äqu. negative Phosphatbilanz entspricht auch in der Größenordnung den früheren Erfahrungen.

Mit Rücksicht auf die durch KMW-Tränkung bedingte beträchtliche Zufuhr anorganischer Sulfate wurden bei diesem Versuch auch die Gesamtsulfate des Harns beider Perioden bestimmt. Die wiederholt schon hervorgehobene Übereinstimmung in der Reaktion auf KMW-Zufuhr zwischen den zeitlich ziemlich weit auseinander liegenden Versuchen *Sgalitzers*, meinen eigenen und den vorliegenden erstreckt sich auch auf das Verhalten des zugeführten Sulfats und Chlorids. Die Teilbilanzen dieser Ionen zeigen durchaus das gleiche Verhalten wie in den früheren Versuchen. Was die Berechnung des hier so wichtigen Sulfations anbelangt, muß ich auf die vorhergegangene V. Mitteilung, l. c., verweisen. Die Berechnung des anorganischen Sulfats auf Grund der aus Normalversuchen errechneten Sulfatmenge, welche vom Eiweiß des genossenen Hafers herrührt, ist wegen der Unsicherheit des letzteren Wertes selbst mit einem, unter Umständen großen, möglichen Fehler behaftet, so daß aus der bei dieser Berechnungsart sich ergebenden geringfügig positiven Sulfatbilanz (2,8 mg-Äqu.) auch nicht einmal mit Sicherheit auf diesen geringen Ansatz geschlossen werden kann, der auch gegenüber einer Aufnahme von mehr als 28 mg-Äqu. anorganischen Sulfats aus dem KMW nicht geeignet ist, den seinerzeit gezogenen Schluß, daß ein Sulfatansatz nicht erfolgt, unsicher zu machen. Positive Sulfatbilanzen dieser Größe, sogar noch größere, wurden auch in den früheren KMW-Versuchen beobachtet. Diese geringfügigen Mengen wurden dann in der Nachperiode sofort wieder abgegeben, wenn sie, wie gesagt, überhaupt angesetzt worden waren und nicht nur errechnet sind. Die Cl-Bilanz ist, ebenso wie damals, auch hier positiv.

Sehr deutlich tritt in der Vorperiode das Mißverhältnis zwischen der Kationengesamtbilanz und Anionengesamtbilanz zutage: einem Ansatz von insgesamt über 63 mg-Äqu. Kationen steht ein solcher von 7 mg-Äqu. Anionen gegenüber, wobei noch der Sulfatansatz, wie oben ausgeführt, nur mit Reserve als wirklicher Ansatz in Rechnung zu stellen ist. Im Zusammenhalt der *Sgalitzer*schen und meiner eigenen früheren Versuche

ergibt sich dasselbe Bild des Überwiegens der Kationen bei der Mineralisierung durch KMW. Nach dem oben Gesagten kommt es also durch die Einwirkung des KMW nicht nur zu einem Ansatz mineralischer Substanz und einer Verschiebung des gegenseitigen Kationenverhältnisses im Sinne einer Ca-Anreicherung, sondern auch, bedingt durch die Verschiebung des Basen-Säureverhältnisses, wahrscheinlich zu einer Alkalisierung des Organismus.

Zur Kritik der auf die Hauptperiode, in welcher das KMW mit Radiumemanation gereicht worden ist, bezüglichen Bilanzen, muß darauf hingewiesen werden, daß meine früheren Versuche über die Beeinflussung der Anionenbilanz durch KMW ergeben hatten, daß die in der ersten Woche der Darreichung eingetretenen Veränderungen im M-S-H in der zweiten Woche der andauernden Tränkung mit KMW nicht etwa weiter fortschreiten, sondern daß das Tier auf dem innerhalb der ersten Woche erzielten Zustande verbleibt. Das Maximum des unter den gegebenen Zuständen Erreichbaren wird anscheinend innerhalb der ersten 8 Tage erzielt, und bei fortdauerndem KMW-Regime wird dieser Zustand festgehalten oder höchstens nur um geringes noch gesteigert. Dies gilt insbesonders für die Phosphatbilanzen, welche damals in den beiden Versuchswochen der Tränkung mit KMW nahezu gleich waren bzw. war bei dem einen Tiere nur noch eine geringfügige Zunahme der Phosphatbilanz zu verzeichnen. Dagegen sank die Phosphatbilanz sofort wieder ab, wenn das KMW durch Leitungswasser ersetzt wurde. Die Veränderungen, welche in der Hauptperiode des *vorliegenden* Versuchs gegenüber der Vorperiode eingetreten sind, können daher nicht als ein weiteres Fortschreiten der KMW-Wirkung aufgefaßt werden, sondern *müssen der zusätzlichen Emanationswirkung zugeschrieben werden.*

Überblickt man die Bilanzen des Tieres in den zwei Perioden, so findet man nicht nur im allgemeinen, sondern auch in den Einzelheiten die Wirkung der Radiumemanation wieder, wie wir sie in den vorangegangenen Versuchen mit Leitungswasser und Emanation an zwei Tieren kennengelernt haben, d. h. Verbesserung der Mineralstoffbilanz überhaupt, im einzelnen insbesondere der Ca-Bilanz und besonders hochgradig der Phosphatbilanz. Trotz der bereits in der Vorperiode erreichten erheblichen Mineralisierung mit 63 mg-Äqu. Kationenansatz, welcher dem von *Sgalitzer* in 14tägiger Versuchsdauer beobachteten geradezu genau entspricht, fand in der Hauptperiode unter dem Emanationsregime noch eine weitere Steigerung auf fast 70 mg-Äqu. statt. Sehr deutlich ist hierbei besonders die Einwirkung auf die Ca-Bilanz. Weder *Sgalitzer*, noch auch ich konnten durch KMW allein bei Hafertieren eine positive Ca-Bilanz erzielen, sondern die Wirkung beschränkte sich darauf, daß der als Folge des einseitigen Haferregimes bestehende Ca-Verlust weitgehend eingeschränkt wurden. Demgegenüber ist bei dem vorliegenden Versuch unter dem kombinierten Einflusse von KMW und Emanation die Ca-Bilanz mit fast 8 mg-Äqu. positiv geworden, eine ganz eklatante Wirkung, wenn man diesem Ansatz die in der Vorperiode mit fast 6 mg-Äqu. negative Ca-Bilanz gegenüberstellt. Die Wirkung auf die Ca-Bilanz ist von der Zufuhr an Ca unabhängig, denn diese war bei *Sgalitzer* in allen Perioden nahezu vollständig identisch gewesen, ebenso wie bei dem vorliegenden Versuch. Auch die, wie erwähnt, beim KMW und der Radiumemanation gleichgerichtete Beeinflussung des Ca auf Harn und Kot fand in der Hauptperiode eine bedeutende Verstärkung in dem Sinne, als der Harn in der Emanationsperiode so wenig Ca enthielt, daß er

praktisch geradezu als Ca-frei imponierte. Nur kaum 3 Proz. der Gesamtausfuhr des Ca wurden durch die Nieren geliefert, gegenüber 22 Proz. beim KMW allein.

Die in den Versuchen mit Leitungswasser beobachtete, durch die Emanation bewirkte Umkehr des Verhältnisses, welches normalerweise zwischen den Bilanzen der Anionen und Kationen vorwaltet, tritt auch in diesem Versuch deutlich zutage. Wenn auch eine tatsächliche Umkehr, ein Mehransatz von Anionen nicht erreicht wurde, zweifellos wegen des so beträchtlichen Kationengewinns, so ist gegenüber einem Manko von 57 Säureäquivalenten, die in der Vorperiode weniger als Kationen angesetzt wurden, dieses Manko in der Hauptperiode auf 22 mg-Äqu. zurückgegangen. Ein geradezu überraschend hoher Phosphatansatz ist in der Emanationsperiode zu verzeichnen: während in der Vorperiode eine unseren bisherigen Erfahrungen entsprechende schwach negative Phosphatbilanz zu verzeichnen war, schwach negativ mit 3,7 mg-Äqu. im Vergleich zu den sonst bei Haferdiät negativen Phosphatbilanzen, ergab sich in der Emanationsperiode der beträchtliche Ansatz von 35 mg-Äqu. Phosphat, welcher allein schon für sich geeignet ist, die Anionenbilanz in ihrer Größenordnung wesentlich zu ändern. Die Größe des Phosphatansatzes ist derart, daß man kaum von einer Addition der beiden nach derselben Richtung der Einsparung gerichteten Wirkungen des KMW und der Emanation sprechen kann, sondern an eine potenzierte Wirkung zu denken veranlaßt ist. Doch ist ein zahlenmäßiger Vergleich zwischen der Summe der durch KMW allein und der durch Emanation allein erzielten Phosphatgewinne mit dem beobachteten Phosphatgewinne bei gleichzeitiger Darreichung von KMW und Emanation nicht möglich, da bei den betreffenden Versuchstieren die Wirkung der Emanation allein festgestellt worden ist und sich aus dem vorliegenden Material Mittelwerte für die Phosphatgewinne durch die beiden Einflüsse deshalb nicht berechnen lassen, weil die einzelnen Werte voneinander zu sehr differieren.

Auch hier wird die Anionenbilanz fast ausschließlich durch das Phosphation beeinflußt, da sich Sulfat und Chlorid so gut wie gar nicht geändert haben.

Schließlich ging auch die Veränderung im Körpergewicht unter dem Einfluß der Radiumemanation durchaus parallel mit den Veränderungen des M-S-H: im ganzen hat das Tier am Ende des Versuchs 60 g gewonnen, an sich zwar ein geringer Wert, der aber in Anbetracht aller Umstände nicht zu übersehen ist.

Zusammenfassend ergibt sich als Wirkung der Radiumemanation auf den M-S-H des Kaninchens folgendes:

1. Die Radiumemanation beeinflußt den M-S-H der Kaninchen im Sinne einer Einsparung sämtlicher mineralischer Substanzen. Diese Mineralisation erstreckt sich insbesondere auf die Einsparung von Calcium und Phosphorsäure, wobei die Calciumausfuhr mehr in den Darm verschoben wird. Zum Unterschied von dem sonst beobachteten Verhalten ist die Anioneneinsparung größer als die Kationeneinsparung, die Anionenbilanz wird stärker beeinflußt als die Kationenbilanz.

2. Bei gleichzeitiger Zufuhr von KMW und Radiumemanation erfolgt eine erhebliche Verstärkung aller Einzelwirkungen des KMW

auf den M-S-H, deren Umfang möglicherweise über eine einfache Addition der gleichgerichteten Wirkungen hinausgeht.

III. Experimenteller Teil.

Hinsichtlich der Tierhaltung und der Gewinnung des Analysenmaterials verweise ich auf die vorangegangenen Mitteilungen, l. c. Die Bestimmung der Chloride im Harn nach vorheriger Klärung mit Kieselgur wurde nach der *Volhard*schen Methode, die im Kot und Hafer nach *Moraczewski*[1]) vorgenommen. Die Phosphate wurden nach vorheriger Entfernung der Kieselsäure nach *Neumann-Woy*[2]) bestimmt. Die Gesamtsulfate des Harns wurden nach vorheriger Klärung mit kolloidalem Eisen nach *Folin*[3]) bestimmt. Zur Bestimmung von Ca und Mg wurden Harn, Hafer und Kot trocken verascht und im Salzsäureauszuge der Glühasche die Bestimmung nach *Mc Crudden*[4]) ausgeführt. K und Na wurden nach feuchter Veraschung des Materials mittels der üblichen Methode als Gesamtchloride bestimmt, Kalium nach der Perchloratmethode ermittelt und Na aus der Differenz berechnet. Das Prager Leitungswasser wurde nach den üblichen Methoden analysiert, der Mühlbrunnen wurde nicht untersucht, sondern die Analysen von *Ludwig* und *Mautner*[5]) den Berechnungen zugrunde gelegt.

Die Messung der Emanationsmengen erfolgte mittels eines Fontaktoskops von *Günther* und *Tegetmaeyer* nach der üblichen Methode. Um möglichst viel Emanation in die Tränkungsflüssigkeiten zu bekommen, wurden die betreffenden Flüssigkeiten stets auf 10° C abgekühlt und dafür gesorgt, daß während des Durchpumpens der Emanation sich ein möglichst kleiner Luftraum über den Flüssigkeiten befinde bzw. sich an der Verteilung der vorhandenen Emanation beteilige.

Die Analysen sind stets durch Doppelbestimmungen gesichert. Hinsichtlich der Berechnungsart der analytischen Ergebnisse und ihrer Darstellung, besonders der Berechnung des Phosphations und der Bilanzierung des Sulfations muß ich auf die vorangegangenen Mitteilungen verweisen.

Die nun folgenden Tabellen enthalten alle ermittelten Versuchsdaten. 100 g des verfütterten Hafers enthielten:

0.0258 g	Cl'	0,73 mg-Äqu.	
1,0778 g	$H_4(PO_4)_3'''''$ . .	18,64 ,,	
0,3696 g	$K^{\cdot}$	9,45 ,,	34,35 Äqu.-Proz.
0,0739 g	$Na^{\cdot}$	3,21 ,,	11,67 ,,
0,0736 g	$Ca^{\cdot\cdot}$	3,67 ,,	13,34 ,,
0,1360 g	$Mg^{\cdot\cdot}$	11,18 ,,	40,64 ,,

In 1 Liter Prager Leitungswasser sind ermittelt worden:

0,0118 g	Cl'	0,34 mg-Äqu.	
Spuren	$H_4(PO_4)_3'''''$		
0,00317 g	$K^{\cdot}$	0,0812 ,,	1,41 Äqu.-Proz.
0,0251 g	$Na^{\cdot}$	1,095 ,,	19,09 ,,
0,0793 g	$Ca^{\cdot\cdot}$	3,96 ,,	69,04 ,,
0,0073 g	$Mg^{\cdot\cdot}$	0,60 ,,	10,46 ,,

[1]) *Moraczewski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 161.
[2]) *Woy*, Treadwells Lehrb. **2**, 373, IX. Aufl.
[3]) *Folin*, Journ. of biol. Chem. **1**, 131, 1906.
[4]) *Mc Crudden*, ebendaselbst **7**, 83.
[5]) Österr. Bäderbuch 1914, S. 289.

Tabelle IV.

Kaninchen Nr. 14. 4 Tage zuvor bei Hafer und Leitungswasser ad libitum im Stoffwechselkäfig gehalten.
1. Normalperiode vom 11. XII bis 18. XII. 2. Hauptperiode vom 19. XII. bis 26. XII.

		Körpergewicht g	Hafer g	Wasser ccm	Harn ccm	Kot, feucht g	Kot, lufttrocken g	Radiumemanation E. S. E.
1. Periode	1. Tag	2480	98	2 mal 50	48	35		
	2. „	2460	97	2 „ 50	82	47		
	3. „	2435	80	2 „ 50	88	30		
	4. „	2380	95	2 „ 50	63	32		
	5. „	2370	68	2 „ 50	65	30		
	6. „	2350	90	2 „ 50	75	28		
	7. „	2340	82	2 „ 50	63	30		
	8. „	2340	88	2 „ 50	56	50		
		Summe:	698	800	550	260	240,3	
2. Periode	9. Tag	2355	90	2 mal 50	48	26		0,91
	10. „	2370	70	2 „ 50	46	19		0,91
	11. „	2380	78	2 „ 50	70	32		1,25
	12. „	2370	84	2 „ 50	64	30		0,96
	13. „	2380	78	2 „ 50	62	35		1,41
	14. „	2380	85	2 „ 50	78	30		1,21
	15. „	2375	75	2 „ 50	74	32		1,48
	16. „	2375	48	2 „ 50	80	75		1,48
		Summe:	608	800	522	229	174,6	8,61

Tabelle V.
Analysenergebnisse bei Kaninchen 14.

Periode	Tränkung		Cl′		$H_4(PO_4)_3'''''$		K˙		Na˙		Ca˙˙		Mg˙˙	
			g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.
1	Leitungswasser allein	800 ccm Wasser	0,0094	0,27	—	—	0,0025	0,06	0,0201	0,88	0,0634	3,16	0,0058	0,48
		698 g Hafer	0,1801	5,07	7,5230	130,08	2,5800	65,98	0,5158	22,42	0,5137	25,64	0,9493	78,07
		Einnahmen:	0,1895	5,34	7,5230	130,08	2,5825	66,04	0,5359	23,30	0,5771	28,80	0,9551	78,55
		550 ccm Harn	0,2528	7,13	5,3923	93,24	1,7140	43,84	0,3750	16,28	0,4474	22,33	0,4874	40,09
		240,3 g Kot	0,0676	1,91	3,4491	59,64	1,0601	27,11	0,0948	4,12	1,1653	58,16	0,3300	27,14
		Ausgaben:	0,3204	9,04	8,8414	152,88	2,7741	70,95	0,4698	20,40	1,6127	80,49	0,8174	67,23
2	Leitungswasser mit Radiumemanation	800 ccm Wasser	0,0094	0,27	—	—	0,0025	0,06	0,0201	0,88	0,0634	3,16	0,0058	0,48
		608 g Hafer	0,1569	4,42	6,5527	113,31	2,2471	57,47	0,4493	19,53	0,4475	22,33	0,8269	68,00
		Einnahmen:	0,1663	4,69	6,5527	113,31	2,2496	57,53	0,4694	20,41	0,5109	25,49	0,8327	68,48
		522 ccm Harn	0,1053	2,97	4,7777	82,62	1,6127	41,24	0,3557	15,46	0,2048	10,22	0,5255	43,33
		174,8 g Kot	0,0410	1,15	1,3053	22,57	0,6388	16,34	0,0690	3,00	0,7018	35,03	0,1678	13,80
		Ausgaben:	0,1463	4,12	6,0830	105,19	2,2515	57,58	0,4247	18,46	0,9066	45,25	0,6933	57,13

Tabelle VI.

Kaninchen Nr. 12. 4 Tage vorher bei Hafer und Leitungswasser ad libitum im Stoffwechselkäfig gehalten. 1. Normalperiode vom 11. XII. bis 18. XII. 2. Hauptperiode vom 19. XII. bis 26. XII.

		Körpergewicht g	Hafer g	Wasser ccm	Harn ccm	Kot, feucht g	Kot, lufttrocken g	Radium-emanation ESE
1. Periode	1. Tag	2480	80	2 mal 50	78	35		
	2. „	2460	68	2 „ 50	63	35		
	3. „	2445	62	2 „ 50	64	30		
	4. „	2430	37	2 „ 50	71	20		
	5. „	2400	35	2 „ 50	104	14		
	6. „	2360	65	2 „ 50	82	20		
	7. „	2360	75	2 „ 50	55	23		
	8. „	2370	65	2 „ 50	57	27		
		Summe:	487	800	574	204	153,5	
2. Periode	9. Tag	2350	60	2 mal 50	75	30		0,91
	10. „	2330	62	2 „ 50	69	22		0,91
	11. „	2340	55	2 „ 50	61	20		1,25
	12. „	2350	67	2 „ 50	73	20		0,96
	13. „	2330	55	2 „ 50	99	23		1,41
	14. „	2300	45	2 „ 50	81	15		1,21
	15. „	2300	50	2 „ 50	78	19		1,48
	16. „	2270	40	2 „ 50	93	18		1,48
		Summe:	434	800	627	167	117,5	8,61

Tabelle VII.
Analysenergebnisse bei Kaninchen Nr. 12.

Periode	Tränkung		Cl'		$H_4(PO_4)_3'''''$		$K^{\cdot}$		$Na^{\cdot}$		$Ca^{\cdot\cdot}$		$Mg^{\cdot\cdot}$	
			g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.	g	mg-Äqu.
1	Leitungswasser allein	800 ccm Wasser	0,0094	0,27	—	—	0,0025	0,06	0,0201	0,88	0,0634	3,16	0,0058	0,48
		487 ccm Hafer	0,1256	3,54	5,2487	90,76	1,8000	46,03	0,3599	15,65	0,3584	17,89	0,6623	54,47
		Einnahmen:	0,1350	3,81	5,2487	90,76	1,8025	46,09	0,3800	16,53	0,4218	21,05	0,6681	54,95
		574 ccm Harn	0,2690	7,59	4,1459	71,69	1,3120	33,55	0,5320	23,12	0,3190	15,92	0,4211	33,84
		153,5 g Kot	0,0297	0,84	1,0181	17,61	0,5685	14,54	0,0815	3,54	0,2893	14,44	0,1411	11,60
		Ausgaben:	0,2987	8,43	5,1640	89,30	1,8805	48,09	0,6135	26,66	0,6083	30,36	0,5622	45,44
2	Leitungswasser mit Radiumemanation	800 ccm Wasser	0,0094	0,27	—	—	0,0025	0,06	0,0201	0,88	0,0634	3,16	0,0058	0,48
		434 g Hafer	0,1120	3,16	4,6775	80,89	1,6041	41,02	0,3207	13,95	0,3194	15,95	0,5903	48,54
		Einnahmen:	0,1214	3,43	4,6775	80,89	1,6066	41,08	0,3408	14,83	0,3828	19,11	0,5961	49,02
		627 ccm Harn	0,1126	3,17	3,6698	63,46	1,2960	33,15	0,3240	14,09	0,1801	8,99	0,3573	29,38
		117,5 g Kot	0,0202	0,57	0,6448	11,15	0,4170	10,67	0,0860	3,74	0,2234	11,15	0,1113	9,15
		Ausgaben:	0,1326	3,74	4,3146	74,61	1,7130	43,82	0,4100	17,83	0,4035	20,14	0,4686	38,53

Tabelle VIII.

Kaninchen Nr. 46. 4 Tage vorher bei Hafer und Leitungswasser ad libitum im Stoffwechselkäfig gehalten.
1. Vorperiode bei Karlsbader Mühlbrunnen vom 19. I. bis 26. I. 2. Hauptperiode bei KMV und Radiumemanation vom 27. I. bis 3. II.

		Körpergewicht g	Hafer g	Karlsbader Mineralwasser ccm	Harn ccm	Kot, frisch g	Kot, lufttrocken g	Radiumemanation ESE
1. Periode	1. Tag	2200	101	2 mal 50	58	45		
	2. „	2210	93	2 „ 50	55	37		
	3. „	2210	80	2 „ 50	60	40		
	4. „	2230	75	2 „ 50	65	26		
	5. „	2235	65	2 „ 50	55	30		
	6. „	2230	53	2 „ 50	60	19		
	7. „	2230	60	2 „ 50	94	19		
	8. „	2230	68	2 „ 50	57	23		
		Summe:	595	800	504	239	223,0	
2. Periode	9. Tag	2215	75	2 mal 50	60	31		1,80
	10. „	2225	75	2 „ 50	46	26		1,69
	11. „	2240	79	2 „ 50	63	27		1,68
	12. „	2225	80	2 „ 50	55	20		1,56
	13. „	2250	75	2 „ 50	47	32		1,68
	14. „	2250	79	2 „ 50	60	17		1,60
	15. „	2265	68	2 „ 50	56	20		1,68
	16. „	2260	74	2 „ 50	60	13		1,75
		Summe:	605	800	447	186	181,7	13,44

Tabelle IX
Analysenergebnisse bei Kaninchen Nr. 46.

Periode	Tränkung		Cl′ g	Cl′ mg-Äqu.	$H_4(PO_4)_3'''''$ g	$H_4(PO_4)_3'''''$ mg-Äqu.	SO_4'' g	SO_4'' mg-Äqu.	K˙ g	K˙ mg-Äqu.	Na˙ g	Na˙ mg-Äqu.	Ca˙˙ g	Ca˙˙ mg-Äqu.	Mg˙˙ g	Mg˙˙ mg-Äqu.
1	KMW*) allein	800 ccm KMW	0,4913	13,86	—	—	1,3757	28,22	0,0678	1,73	1,3908	60,47	0,1049	5,23	0,0368	3,03
		595 g Hafer	0,1535	4,33	6,4127	110,89	—**)	—	2,1991	56,24	0,4397	19,12	0,4379	21,86	0,8092	66,55
		Einnahmen:	0,6448	18,19	6,4127	110,89	1,3757	28,22	2,2269	57,97	1,8305	79,59	0,5428	27,09	0,8460	69,58
		504 ccm Harn	0,2972	8,39	4,7669	82,44	2,3616	49,17	1,6356	41,83	0,6735	29,28	0,1512	7,37	0,3551	29,20
		223 g Kot	0,0674	1,90	1,8591	32,15	Abzug†)	23,80	0,3249	8,31	0,0925	4,02	0,5119	25,55	0,3063	25,19
		Ausgaben:	0,3646	10,29	6,6260	114,59		25,37	1,9605	50,24	0,7660	33,30	0,6631	32,92	0,6614	54,39
2	KMW mit Radiumemanation	800 ccm KMW	0,4913	13,86	—	—	1,3757	28,22	0,0678	1,73	1,3908	60,47	0,1049	5,23	0,0368	3,03
		605 g Hafer	0,1561	4,40	6,5205	112,73	—	—	2,2361	57,19	0,4471	19,44	0,4453	22,22	0,8228	67,67
		Einnahmen:	0,6474	18,26	6,5205	112,73	1,3757	28,22	2,3039	58,92	1,8378	79,91	0,5502	27,45	0,8596	70,70
		447 ccm Harn	0,1939	5,47	4,0266	69,62	2,3760	49,47	1,3150	33,63	1,0200	44,34	0,0112	0,56	0,4490	36,93
		181,7 g Kot	0,0812	2,29	1,0401	17,99	Abzug	24,20	0,4334	11,05	0,1091	4,74	0,3792	18,93	0,2013	16,55
		Ausgaben:	0,2751	8,76	5,0667	87,61		25,27	1,7484	44,68	1,1291	49,08	0,3904	19,49	0,6503	53,48

*) KMW: Karlsbader Mühlbrunnen aus Versandflaschen.

**) Anorganisches vorgebildetes Sulfat kommt im Hafer und Kot nur in für die Bilanzierung bedeutungslosen Spuren vor und wurde deshalb nicht eingesetzt.

†) Abzug bedeutet jene Menge von mg-Äqu. SO_4, welche nach Normalversuchen aus dem Eiweiß des Hafers gebildet und ausgeschieden wird, und zwar im Durchschnitt 4 mg-Äqu. SO_4 pro 100 g aufgenommenen Hafers.

Zur Biochemie der funktionellen Zustände der Nervenzentren[1].

Von

Henriette Gorodissky.

(Aus dem Ukrainischen Biochemischen Institut in Charkow.)

(Eingegangen am 31. Juli 1926.)

Die biochemische Erforschung des Zentralnervensystems kann auf zwei Wegen vor sich gehen. Der erste ist der Weg der Untersuchung der chemischen Statik des Gehirns, der zweite die Untersuchung der chemischen Dynamik. Die Untersuchung der chemischen Statik des Gehirns führt zur Entscheidung einer der wichtigsten Fragen betreffs der Beziehungen zwischen der Funktion der einzelnen Gehirnabteilungen und ihrer morphologischen und chemischen Struktur. Die chemische Zusammensetzung funktionell und histologisch verschiedener Rindenfelder des Großhirns ist verschieden. Diese Verschiedenheit wiederholt sich mit einer gewissen Gesetzmäßigkeit bei allen Gehirnen, weshalb es möglich ist, funktionell verschiedenen Abschnitten der Hirnrinde eine bestimmte chemische Charakteristik zu geben und die Grundlage „einer chemischen Topographie" der Rinde des Großhirns zu legen[2].

Die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung des Gehirns nicht als eines solchen im ganzen, sondern nach den einzelnen Rindenfeldern hin, entsprechend der topographischen Verteilung seiner Funktionen, d. h. also die Untersuchung der chemischen Topographie des Gehirns, gibt nicht bloß ein Bild von der chemischen Struktur eines jeden einzelnen Abschnitts der Rindenoberfläche, sondern sie sagt auch aus, daß die Verschiedenheit in der chemischen Struktur nicht nur einer verschiedenen Funktion, sondern auch mit einer Verschiedenheit in der Entwicklung dieser Funktion verbunden ist, und daß eine ganze Reihe von Faktoren, wie Geschlecht und Alter, in ihrem Einfluß auf die chemische Zusammensetzung des Gehirns diesen besonders deutlich in einzelnen Rindenabschnitten des Gehirns zeigen[2].

---

[1]) Vorgetragen am Physiologenkongreß der sowjet. Republik in Leningrad am 28. Mai 1926.

[2]) *H. Gorodissky*, diese Zeitschr. **164**, H. 4/6, 446, 1925.

Wenn die Nervenzellen der Hirnrinde, die verschiedene physiologische Funktionen erfüllen, sich voneinander durch ihre chemische Zusammensetzung unterscheiden und die Besonderheiten der chemischen Struktur untrennbar mit Besonderheiten des Stoffwechsels in diesen Zellen verbunden sein müssen, so muß auch der andere Weg in der Erforschung des Zentralnervensystems, der Weg der Untersuchung der chemischen Dynamik des Gehirns, dessen Ziel die Erkenntnis der funktionellen Bedeutung seiner einzelnen chemischen Bestandteile ist, nach den von der chemischen Topographie des Gehirns gewiesenen Richtungen hinführen.

Zahlreiche Beobachtungen und experimentelle Untersuchungen zeigten, daß sich die normale chemische Zusammensetzung des Gehirns sowohl unter dem Einfluß von Erkrankungen dieser selbst, die vom Bilde einer psychischen Störung begleitet werden [Paralysis progressiva[1]) Dementia praecox[2]) usw.], als auch unter dem Einfluß aller möglicher Allgemeinerkrankungen, die mit schweren Stoffwechselstörungen verbunden sind, mehr oder minder stark ändert[3]). Der Stoffwechsel des Gehirns und seine chemische Zusammensetzung bleibt auch nicht unverändert unter dem Einfluß einer ganzen Reihe von experimentellen Störungen seiner Funktionen, wie z. B. von elektrischen Reizungen, Vergiftung mit verschiedenen Giften usw. Derartige Ursachen rufen beinahe immer neben den Änderungen im Chemismus des Gehirns auch bestimmte Veränderungen seiner morphologischen Struktur hervor. In keinem dieser Fälle darf die Veränderung im Chemismus des Gehirns ausschließlich Veränderungen seines funktionellen Zustandes zur Last gelegt werden, wie dies nicht selten getan wird, sondern häufiger kann sie durch pathologische Veränderungen des Nervengewebes infolge der Wirkung eines starken physischen oder chemischen Agens, z. B. einer akuten Vergiftung mit Stoffen, die auf die chemischen Prozesse in der Zelle heftig einwirken und ihre physiko-chemischen Lebensbedingungen stören, oder auch durch sekundäre Veränderungen des Nervengewebes infolge pathologischer Anhäufung von Produkten einer rückläufigen Metamorphose im Organismus erklärt werden, wie bei einigen langdauernden chronischen Vergiftungen und Allgemeinerkrankungen jeglicher Art. Alles das geht natürlich weit über die Grenzen der Physiologie in das gewaltige Gebiet der Pathologie und Toxikologie hinaus. Es taucht nun die Frage auf, *ob die physiologischen Veränderungen der Funktionszustände der Nervenzentren von bestimmten Änderungen in der Intensität oder im Charakter der chemischen Prozesse begleitet werden,*

---

[1]) *Pighini,* diese Zeitschr. **63**, 304, 1914.
[2]) *Derselbe,* ebendaselbst **113**, 231, 1921.
[3]) *Ederer,* Monatsschr. f. Kinderheilk. **24**, 244, 1922.

die in ihnen verlaufen. Die experimentelle Entscheidung dieser Frage muß vor allem unbedingt folgender Forderung entsprechen: *Die Veränderung des funktionellen Zustandes der Zentren muß ohne Anwendung irgend einer mehr oder minder starken physischen oder chemischen Einwirkung hervorgerufen werden.* Nur in diesem Falle kann eine etwa stattfindende Veränderung im Chemismus des Gehirns wirklich auf die Rechnung einer Änderung seines Funktionszustandes gesetzt werden, des Übergangs von Arbeit zur Ruhe und umgekehrt von Ruhe zur Arbeit, und nicht auf die Rechnung einer ganzen Reihe von Nebenursachen.

Die Technik des Experiments bestand darin, daß dem Tiere (Katze) die Lider beider Augen durch eine Naht vereinigt wurden, wodurch die Lichtreizung der Augen auf ein Minimum herabgesetzt wurde, optische Eindrücke beinahe ausgeschlossen wurden. Katzen mit unvernähten Augen wurden als Tiere betrachtet, bei denen die Sehzentren sich im Zustande gewöhnlicher Arbeit befinden, Katzen mit vernähten Augen aber als Tiere, bei denen sich die entsprechenden Zentren im Zustande bedeutend herabgesetzter Tätigkeit, beinahe im Ruhezustande befinden. Der Charakter und die Intensität der chemischen Prozesse in diesem und jenem Falle kann als Ruhe- oder Arbeitsstoffwechsel der diesbezüglichen Nervenzellen und -fasern angesehen werden. Die Lidnähte blieben 3 bis 11 Tage lang liegen, worauf die Tiere getötet und ihre Gehirne chemisch untersucht wurden.

Den Gegenstand der chemischen Untersuchung bildete einer der Grundprozesse der Lebenstätigkeit einer jeden Zelle — der Prozeß der Eiweißspaltung, der Proteolyse.

Zur Untersuchung kam:

1. graue Rindensubstanz aus der Gegend der Area striata — die optischen Rindenzentren;

2. graue Substanz aus dem Kern des Corp. geniculat. lat. — die subkortikalen Zentren;

3. der Tractus opticus — die optischen Bahnen; weiterhin Zentren, die der experimentellen Einwirkung nicht ausgesetzt waren. Dies waren:

4. graue Rindensubstanz der motorisch-sensorischen Abschnitte (in den Protokollen als motorisches Gebiet bezeichnet) und

5. graue Substanz aus dem Nucl. caudat.

In allen Fällen wurde Substanz aus der rechten und linken Hemisphäre zusammen untersucht. Von den subkortikalen Sehzentren wurde für die Untersuchung das Corp. genicul. lat. ausgewählt, da die hauptsächlichste Masse der *Gratiolet*schen Sehstrahlung aus Fasern der im Corp. genicul. lat. gelegenen Zellen[1]) besteht. Auf diese Weise wurden zur Untersuchung die Leitungsbahnen (Tract. opt.) und Nervenzentren der Sehempfindung

[1]) *Kappers*, „Die vergleichende Anatomie des Nervensystems usw.", 1921.

(subkortikale und kortikale Sehzentren) genommen und ebenso Zentren, die keine Beziehung zur Aufnahme von Gesichtsempfindungen haben.

Die Mikromethodik bewährte sich auch hier, indem sie aus kleinen Partikelchen von 20 bis 50 mg der frischen Substanz eine genaue Bestimmung des Gesamt- und Reststickstoffs uns aus ihrem Verhältnis zueinander über die Intensität der im Augenblick des Todes des Tieres in den entsprechenden Zentren ablaufenden proteolytischen Prozesse einen Schluß zu ziehen ermöglichte. Die Mikrobestimmung des Gesamt- und Reststickstoffs erfolgte nach der kombinierten Methode von *Bang*[1]) und *Pregl*[2]).

Das Tier wurde durch Köpfung getötet, das Gehirn sofort herausgenommen, die weiche Hirnhaut entfernt und mit einem dünnen Skalpell die graue Substanz des nötigen Rindenabschnitts oder des subkortikalen Kernes von der anliegenden weißen Gehirnsubstanz sorgfältig abgelöst. Die abpräparierte Substanz wurde rasch in einer Reibschale zerrieben und sofort in dünner, gleichmäßiger Schicht auf ein Stückchen (NH_3-freies) Filtrierpapier gelegt. Die Partikelchen wurden auf Torsionswagen von *Hartmann* und *Braun* gewogen. Nach Trocknung im Exsikkator über Chlorcalcium wurden die Papierstückchen in einem Probiergläschen im Verlauf von 16 bis 20 Stunden mit 6 ccm *Bang*scher Phosphormolybdänlösung ausgezogen. Hierauf wurde die Flüssigkeit in einen kleinen *Kjeldahl*schen Kolben geschüttet, die Papierchen wurden ein paarmal in 1 bis 1 ½ ccm der Extraktionsflüssigkeit abgespült, und diese wurde hernach in dasselbe Kölbchen gegossen. Das Papierchen wurde in ein ebensolches Kjeldahlkölbchen hingebracht. Die Flüssigkeit und das Papierchen wurden jedes für sich mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure verbrannt, ohne daß ein Katalysator hinzugefügt wurde, da bei Anwesenheit von Phosphormolybdänsäure die Verbrennung rasch genug vor sich geht. Auf diese Weise befand sich im ersten Kölbchen der aus dem Gehirnpartikelchen gezogene Reststickstoff, im anderen aber der Nicht-Reststickstoff, d. h. der Stickstoff der Eiweiß- und Lipoidstoffe. Die Summe gibt die Gesamtstickstoffwerte. Nach der Verbrennung wurde das Ammoniak mit Wasserdampf in einem Behälter mit 2 ccm Schwefelsäurelösung (n/100 zur Bestimmung des Reststickstoffs und n/10 zur Bestimmung des Nicht-Reststickstoffs) hinübergetrieben. Dann folgt Titrierung des gekochten, heißen Destillats aus der Mikrobürette n/100 (bzw. n/10) NaOH mit Methylrot als Indikator. Diese Methode gibt genug genaue Resultate. Beispielsweise bringe ich einige parallele Bestimmungen (Tabelle I).

Tabelle I.

Gewichtsmenge	Rest-N	N der Eiweiß- u. Lipoidstoffe	Gesamt-N
mg	in Proz. der frischen Substanz		
46,9	0,257	2,354	2,611
37,7	0,252	2,364	2,616
39,6	0,164	1,769	1,933
37,9	0,160	1,774	1,934
47,2	0,199	1,720	1,919
39,5	0,191	1,734	1,928

[1]) *Bang*, „Mikromethoden der Blutuntersuchung", 1922.

[2]) *Pregl*, „Die quantit. organ. Mikroanalyse" 1923.

Die graue Substanz im Corp. genicul. lat. stellt bei Katzen eine so geringe Menge vor, daß wir uns mit bloß einem einzigen Partikelchen von 20 bis 25 mg begnügen mußten. Die anderen Abschnitte des Gehirns gaben aber die Möglichkeit, zwei bis drei Gewichtsmengen zu verarbeiten.

Die sehenden wie die nichtsehenden Katzen wurden gleich gehalten und veränderten sich während der ganzen Versuchszeit in bezug auf ihr Gewicht nicht.

Die Tabelle II bringt die Resultate der Hirnanalysen der sehenden Katzen.

Tabelle II.

Katze Nr.	Rest-N (in Proz. der frischen Substanz)	Gesamt-N (in Proz. der frischen Substanz)	Rest-N in Proz. von Gesamt-N	Rest-N (in Proz der frischen Substanz)	Gesamt-N (in Proz der frischen Substanz)	Rest-N in Proz. von Gesamt-N
	Area striata			Motor. Rindenzentra		
5	0,195	1,923	10,14	0,353	2,231	15,82
6	0,256	2,155	11,88	0,143	2,015	7,09
7	0,250	2,057	12,16	0,412	2,417	17,05
8	0,218	1,612	13,52	0,098	1,523	6,44
14	0,270	2,282	11,82	0,195	1,794	10,87
23	0,212	2,081	10,19	0,152	1,776	8,56
26	0,203	1,911	10,62	0,205	2,211	9,27
27	0,199	1,824	10,41	0,168	1,998	8,41
28	0,223	1,943	11,48	0,187	2,001	9,35
Minimum	0,195	1,612	10,14	0,098	1,523	6,44
Maximum	0,270	2,282	13,52	0,412	2,417	17,05
Mittelwerte	*0,225*	*1,976*	*11,36*	*0,213*	*1,996*	*10,32*
	Corp. genicul. lat.			Nucl. caudat.		
23	0,296	2,255	13,13	0,156	1,807	8,63
26	0,231	1,987	11,63	0,173	1,842	9,39
27	0,202	2,011	10,04	0,162	1,921	8,43
28	0,243	2,005	12,12	0,181	1,798	10,07
Minimum	0,202	1,987	10,04	0,156	1,798	8,43
Maximum	0,296	2,255	13,13	0,181	1,921	10,07
Mittelwerte	*0,243*	*2,064*	*11,73*	*0,168*	*1,842*	*9,13*

Tract. opticus.

Katze Nr.	Rest-N (in Proz. der frischen Substanz)	Gesamt-N (in Proz. der frischen Substanz)	Rest-N in Proz. von Gesamt-N
23	0,141	1,743	8,09
26	0,173	1,918	9,39
27	0,162	1,868	8,67
28	0,178	1,907	9,33
Minimum	0,141	1,743	8,09
Maximum	0,178	1,918	9,39
Mittelwerte	*0,163*	*1,934*	*8,87*

Ungeachtet dessen, daß der Gehalt an Gesamt- und Reststickstoff in den verschiedenen kortikalen und subkortikalen Abschnitten des Gehirns

und einigermaßen auch in den optischen Bahnen einander verhältnismäßig nahestehen, ist es dennoch nicht schwer, die charakteristischen Besonderheiten eines jeden dieser kleinen Gebiete herauszufinden.

Die größten Schwankungen im Gesamt- und Reststickstoffgehalt zeigt das motorische Rindengebiet (Reststickstoff: 0,098 bis 0,412 Proz. der frischen Substanz und Gesamtstickstoff: 1,523 bis 2,417 Proz. der frischen Substanz) und dementsprechend auch die weitesten Schwankungen in der Zahl, die die Intensität des proteolytischen Zerfalls in den Zellen dieses Zentrums im Augenblick des Todes des Tieres wiedergibt, d. h. in der Menge des Reststickstoffs in Prozenten des Gesamtstickstoffs (7,09 bis 17,05 Proz.). In den anderen Abschnitten sind diese Schwankungen viel geringer. Die größten, aber auch die niedrigsten Mengen des Gesamt- und Reststickstoffs werden in ebendiesem motorischen Gebiet gefunden. Die geringsten mittleren Mengen von Reststickstoff finden sich im Nucl. caudat. (0,168 Proz.) und besonders im Tract. opt. (0,163 Proz.), wobei die maximalen Werte hier nicht die minimalen in den optischen kortikalen und subkortikalen Zentren erreichen. Die Mengen an Gesamtstickstoff in Prozenten der frischen Substanz stehen in allen Abschnitten im Mittel einander sehr nahe (Tabelle II). Da aber die geringste Menge des Trockenrückstandes sich in der Rindensubstanz befindet, hernach in der subkortikalen und die größte Menge in den weißen Fasern des Tract. opt. (Tabelle III), so ist doch die Menge an Gesamtstickstoff im Vergleich zur Menge anderer den Trockenrückstand bildenden Stoffe in der Rinde am größten und in den weißen Fasern am geringsten, was mit den bekannten Angaben von *Lenz*[1]) vollkommen übereinstimmt.

Tabelle III.

Trockenrückstand.

Katze Nr.	Area striata Proz.	Motor. Rindenzentra Proz.	Corp. genic. lat. Proz.	Nucl. caud. Proz.	Tract. opt. Proz.
29	19,29	—	24,48	22,22	31,37
30	19,91	19,19	—	20,43	32,75
32	19,94	20,17	25,60	20,53	33,75
34	19,79	—	—	22,67	32,31

Die Intensität des Eiweißzerfalls (Reststickstoff in Prozenten vom Gesamtstickstoff in der Tabelle II) zeigt sich im Augenblick des Todes des sehenden Tieres im Mittel in allen untersuchten kortikalen und subkortikalen Nervenzentren beinahe gleich stark. In jedem Einzelfalle kann die Proteolyse in dem einen oder anderen Abschnitt intensiver sein, wobei dies außerordentlich schwer mit dem Verhalten des Tieres während der ganzen Zeit seines Verweilens im Laboratorium oder in den letzten Augenblicken seines Lebens in Zusammenhang zu bringen ist. Bedeutend schwächer sind die proteolytischen Prozesse in den optischen Bahnen (im Mittel — 8,87). Diese Beobachtung bestätigt vollkommen die Angaben von *Winterstein* und *Hirschberg*[2]), die in ihren Arbeiten über den Stoffwechsel am isolierten, überlebenden zentralen (Hirn und Rückenmark) und peri-

[1]) *Lenz*, Iswestija Woenno-medizin. Akadem.

[2]) *Winterstein* und *Hirschberg*, Zeitschr. f. phys. Chem. **108**, 85, 1919.

pheren (N. ischiadicus) Nervensystem von Fröschen fanden, daß der Phosphor-, Stickstoff- und Kohlehydratstoffwechsel in den peripheren Nerven $^1/_2$- bis $^1/_3$mal langsamer vor sich geht als in den zentralen Organen. Zu demselben Schluß eines minder intensiven, langsameren Stoffwechsels in den Nervenfasern gegenüber dem in den Nervenzellen kam auch *Krontowski*[1]), der die Geschwindigkeit des Glykolyseverbrauchs und der Konzentrationsänderung der Wasserstoffionen der Nährflüssigkeit durch überlebende Gewebskulturen aus der grauen und weißen Gehirnsubstanz von Kaninchen untersuchte.

Ein anderes Bild gibt die chemische Struktur dieser Abschnitte im Gehirn der Katzen mit den vernähten Lidern (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Katze Nr.	Lebensdauer mit vernähten Lidern in Tagen	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N
		in Proz. der frischen Substanz			in Proz. der frischen Substanz		
		Area striata			Motor. Rindenzentra		
13	3	0,155	1,694	9,14	0,121	1,517	7,98
22	3	0,223	2,320	9,61	0,289	2,237	12,92
3	4	0,163	1,933	8,43	0,344	2,150	16,00
9	4	0,163	1,756	9,28	0,202	1,949	10,36
4	5	0,137	1,681	8,15	0,199	1,701	11,11
11	6	0,143	1,659	8,62	0,262	2,083	12,10
12	6	0,117	1,632	7,17	0,147	1,702	8,64
15	6	0,140	1,954	7,16	0,282	1,809	15,59
19	6	0,138	1,832	7,52	0,180	1,880	9,57
2	7	0,118	1,477	8,20	0,127	1,571	8,08
10	7	0,121	1,543	7,84	0,191	1,668	11,45
1	8	0,161	1,662	9,69	0,157	1,715	9,15
16	8	0,167	1,893	8,29	0,185	2,056	9,00
18	8	0,135	1,856	7,27	—	—	—
17	9	0,129	1,945	6,63	0,223	1,411	15,80
25	11	0,185	2,231	8,29	0,256	2,311	11,08
Min.		0,117	1,477	6,63	0,121	1,411	7,98
Max.		0,223	2,320	9,69	0,344	2,311	16,00
Mittel		*0,150*	*1,817*	*8,21*	*0,211*	*1,851*	*11,26*
		Corp. genicul. lat.			Nucl. caudat.		
22	3	0,144	1,524	9,45	0,307	2,999	10,27
15	6	0,184	2,060	8,93	0,145	1,571	9,23
19	6	0,199	2,327	8,55	0,153	1,771	8,64
16	8	0,157	2,157	7,28	0,198	1,879	10,54
18	8	0,192	2,049	9,37	0,199	1,969	10,11
17	9	0,146	2,129	6,86	0,181	1,860	9,73
25	11	0,112	1,991	5,63	0,193	1,887	10,23
Min.		0,112	1,524	5,63	0,145	1,571	8,64
Max.		0,199	2,327	9,45	0,307	2,999	10,54
Mittel		*0,162*	*2,034*	*8,01*	*0,197*	*1,991*	*9,82*

[1]) *Krontowski*, Vortrag gehalten am Physiologenkongreß in Leningrad Mai 1926.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Tract. opticus.

Katze Nr.	Lebensdauer mit vernähten Lidern in Tagen	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N
		in Proz. der frischen Substanz		
22	3	0,170	2,067	8,22
15	6	0,137	1,782	7,69
19	6	0,105	1,658	6,33
16	8	0,123	1,899	6,48
18	8	0,186	2,099	8,86
17	9	0,099	1,887	5,25
25	11	0,115	1,731	6,61
Min.		0,099	1,658	5,25
Max.		0,186	2,099	8,86
Mittel		*0,134*	*1,876*	*7,07*

Die an die Augenlider angelegten Nähte verhinderten, ohne die Augen zu versehren und die übrigen Lebensbedingungen des Tieres zu verändern, den Zutritt von Lichtreizungen zum Auge und setzten dadurch die Arbeit der optischen Bahnen und zentralen optischen Zellen auf ein Minimum herab. Dementsprechend besteht in diesem Falle stets eine ganz bestimmte Herabsetzung der proteolytischen Prozesse in den Sehzentren und optischen Bahnen (Tabelle V). Diese Herabsetzung betrifft bloß die optischen Abschnitte des Gehirns; weder in dem motorischen Rindenabschnitt noch im Nucl. cau lat. finden Veränderungen des Chemismus statt.

Tabelle V.

	Rest-N in Proz. des Gesamt-N	
	Sehende Katzen	Nicht sehende Katzen
Area striata	11,36	8,21
Motorisches Rindengebiet	10,32	11,26
Corp. genicul. lat.	11,73	8,01
Nucl. caudat.	9,13	9,82
Tract. opt.	8,87	7,07

Die größten Zahlen, die für die optischen Abschnitte der nicht sehenden Tiere erhalten wurden, erreichen die minimalen Zahlen in diesen Abschnitten der normalsehenden Tiere kaum (Tract. opt.) oder überhaupt nicht (Ar. striata und Corp. genicul. lat.). Gleichzeitig bleibt die mittlere Intensität des Eiweißzerfalls im Nucl. cadat. im allgemeinen unverändert, während im motorischen Gebiet dieselben weiten Schwankungen (7,98 bis 16,00) beobachtet werden, wobei aber das Mittel im ganzen dem früheren entspricht.

Wenn man die Stärke der Proteolyse in allen Abschnitten des Gehirns der sehenden Katzen 100 gleich setzt, so bleibt die Proteolyse im motorischen Rindengebiet und im Nucl. cadat. der blinden Katzen ebenfalls fast 100, fällt aber in der Area striata auf 72 Proz., im Corp. genicul. lat. auf 68 Proz. und im Tract. opt. auf 80 Proz.

Die Abnahme des proteolytischen Zerfalls ist also in den optischen Zellen und Fasern nicht gleichmäßig. Die Zellen mit rascherem Stoffwechsel bei der Arbeit geben in der Ruhe im allgemeinen eine Herabsetzung der Intensität der Proteolyse um 28 bis 32 Proz., die Fasern mit dem langsameren Stoffwechsel geben auch eine geringere Intensitätsverminderung der Proteolyse, im Mittel bloß um 20 Proz.

Der Reststickstoff stellt einen ganz bestimmten prozentuellen Teil des Gesamtstickstoffs vor, der sich aus folgenden zwei Ursachen nach dieser oder jener Richtung hin verändern kann: 1. Wenn sich die Menge des Reststickstoffs selbst entweder vergrößert oder vermindert oder 2. wenn sich die Menge der Eiweiß- oder Lipoidstoffe verändert. Im vorliegenden Falle bleibt die Menge des Gesamtstickstoffs im allgemeinen unverändert, bei ganz unzweideutigem Absinken der Reststickstoffmenge in der Area striata im Mittel um 33 Proz. (von 0,225 auf 0,150 Proz.), im Corp. genicul. lat. ebenfalls um 33 Proz. (von 0,243 auf 0,162 Proz.) und im Tract. opt. um 18 Proz. (von 0,136 auf 0,134 Proz.). Deshalb fällt die Menge des Reststickstoffs in Prozenten zum Gesamtstickstoff nicht infolge der vermehrten Synthese von Eiweiß in den nicht arbeitenden Sehzellen und Sehfasern, sondern infolge Verminderung ihres Abbaues. Mit anderen Worten:

Die Einstellung der Lichtreizungen der Augen veranlassen eine Verlangsamung der Proteolyse in den optischen Fasern und Zellen der Sehzentren, ohne auf die Proteolyse anderer Zentren im Gehirn, die keine Beziehung zur Aufnahme von Lichtempfindungen haben, einen Einfluß auszuüben.

Wenn in Beantwortung der Verhinderung des Zutritts von Lichtstrahlen zum Auge die Prozesse des Eiweißzerfalls in den optischen Zuleitungsbahnen und den die Lichteindrücke verarbeitenden Nervenzellen zurückgehen, so drängt sich ganz von selbst der Gedanke auf, ob sich diese Prozesse nicht vielleicht verstärken, wenn die nicht sehenden Tiere durch Fortnahme der Lidnähte von beiden Augen wiederum zu sehenden gemacht werden.

Katzen, deren Lider 5 bis 9 Tage lang vernäht gewesen waren, d. h. also eine Zeit, die hinreichend war, damit eine starke Herabsetzung der Proteolyse in den entsprechenden Gehirnabschnitten erfolgen konnte (Tabelle IV), solchen Katzen wurden die Lidnähte von beiden Augen herabgenommen und dieser Augenblick wurde verzeichnet. Hierauf blieben die Tiere dem gewöhnlichen Tageslicht ausgesetzt, wobei die optischen Zentren in den Zustand physiologischer Arbeit zurückkehrten. Nach kurzer Zeit wurde das Tier durch Köpfung getötet und das Gehirn wurde wie in den früheren Versuchen untersucht.

Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle VI wiedergegeben.

24 Stunden nach der Abnahme der Lidnähte kehrte die Intensität der Proteolyse in beiden Sehzentren und den optischen Bahnen zur Norm des Arbeitsstoffwechsels zurück (Versuch 20), ein Gleiches erfolgte nach 2 Stunden (Versuch 21) und selbst nach 15 Minuten (Versuch 31). Die Intensität der Proteolyse in den Tract. opt. und den subkortikalen Sehzentren kehrte zur Norm des Arbeitsstoffwechsels sowohl nach 6 Minuten (Versuch 24), wie auch nach 4 Minuten (Versuch 33) zurück; in den optischen Rindenzentren blieb sie dennoch etwas niedriger — an der oberen Grenze der Norm des Ruhestoffwechsels.

Tabelle VI.

Katze Nr.	Lebensdauer mit vernähten Lidern in Tagen	Dauer der Lichtreizung	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N
			in Proz. der frischen Substanz			in Proz. der frischen Substanz		
			Area striata			Motor. Rindencentra		
20	5	24h	0,231	1,713	13,48	0,254	2,016	12,60
21	8	2	0,207	1,946	10,64	0,341	2,113	16,14
31	9	15'	0,201	1,938	10,37	—	—	—
24	7	6	0,136	1,569	8,67	0,168	1,578	10,65
33	7	4	0,191	2,163	8,83	0,263	2,012	13,07
			Corp. genicul. lat.			Nucl. caudat.		
20	5	24h	0,250	1,520	16,45	0,268	1,607	16,68
21	8	2	0,227	2,105	10,78	0,167	1,799	9,28
31	9	15'	0,213	1,759	12,11	0,179	1,950	9,18
24	7	6	0,220	1,900	11,58	0,167	1,831	9,12
33	7	4	0,198	1,588	12,47	0,187	1,942	9,63

Tract. opticus.

Katze Nr.	Lebendauer mit vernähten Lidern in Tagen	Dauer der Lichtreizung	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N
			in Proz. der frischen Substanz		
20	5	24h	0,138	1,516	9,10
21	8	2	0,176	1,893	9,30
31	9	15'	0,171	2,012	8,50
34	7	6	0,169	1,874	9,03
33	7	4	0,164	1,950	8,41

Wenn schon einige Minuten freier Einwirkung gewöhnlichen, zerstreuten Tageslichtes auf die Netzhaut ausreichend sind, um den Ablauf der Eiweißzerfallprozesse sowohl in den optischen Zentren wie auch in den optischen Bahnen zu beschleunigen, *so verstärkt demnach die Reizung des Auges durch Licht die Proteolyse in den die Lichtreizung fortleitenden Nervenbahnen und in den sie empfangenden Nervenzellen.*

Noch deutlicher und plastischer sprechen hiervon die Versuche an jungen Kätzchen. Diese werden blind geboren; erst nach 7 bis 9 Tagen bildet sich die Lidspalte, und dann erst erreichen die Lichtstrahlen frei, durch keine geschlossenen Lider mehr behindert, das erstemal die Netzhaut. Hier ist der natürliche Versuch ähnlich den von uns an ausgewachsenen Katzen vorgenommenen. Die Intensität der Proteolyse in der Area striata des Gehirns eines sehend gewordenen Kätzchens zeigt im Verhältnis zu den Gehirnen von Kätzchen, die ihre Augen noch nicht geöffnet haben, eine Veränderung des Prozesses unter der Einwirkung der ersten Lichtreize (Tabelle VII).

Die Kätzchen 1 und 2 stammen beide von einer Mutter. Am sechsten Tage nach der Geburt wurden dem Kätzchen 2 an die noch geschlossenen Lider Nähte angelegt. Am neunten Tage hat sich beim Kätzchen 1 die

Lidspalte gebildet, am selben Tage werden beide getötet. Die Intensität der Proteolyse in den optischen Rindenzentren beträgt beim blinden Kätzchen 6,95, beim sehenden 9,29. Derselbe Effekt zeigt sich bei den Kätzchen 3, 4, 5, 6 eines Wurfes. Hier wurden die Nähte bei den Tieren 3 und 4 am fünften Lebenstage angelegt, da die Lider noch geschlossen waren. Am achten Tage wurde das sehend gewordene Kätzchen 6 und das vernähte Kätzchen 3 getötet. Das am siebenten Tage sehend gewordene Kätzchen 5 wurde mit offenen Augen gelassen und am zwölften Tage, nach 5 Tagen Sehens, getötet. Gleichzeitig mit ihm wurde das Kätzchen 4 getötet, das alle 12 Tage seines Lebens nichtsehend geblieben war. Das Resultat erhellt aus der Tabelle VII. Seinem Charakter nach ein wenig verschieden von diesem Versuch ist der an den Kätzchen 7 und 8 eines Wurfes. Bei ihnen öffnete sich die Lidspalte am neunten Tage. Tags darauf wurde dem Kätzchen 7 eine Lidnaht angelegt und am folgenden Tage wurden beide getötet. Die Untersuchung ergab dasselbe Resultat wie bei den erwachsenen Tieren (Tabelle VII). Die ganze Zeit ihres Lebens wurden die Kätzchen mit der Milch ihrer Mütter gefüttert.

Tabelle VII.

Kätzchen	Rest-N	Gesamt-N	Rest-N in Proz. von Gesamt-N	Bemerkungen
	in Proz. der frischen Substanz			
2	0,087	1,251	6,95	Blind
1	0,130	1,392	9,29	Blind, später sehend
3	0,125	1,404	8,90	Blind
6	0,404	1,842	21,93	Blind, später sehend
4	0,178	1,622	10,97	Blind
5	0,320	1,696	18,87	Blind, später sehend
7	0,384	1,651	23,26	Blind, sehend, von neuem blind
8	0,624	1,950	32,00	Blind, später sehend

Auf diese Weise *ist also eine mehrstündige Reizung der Netzhaut mit gewöhnlichem Tageslicht hinreichend, um die Intensität der Proteolyse in den noch nicht vollkommen entwickelten optischen Rindenzentren stark zu vergrößern* (Kätzchen Nr. 1 und 2, 3 und 6). *Eine gleiche Lebensdauer der jungen Tiere eines Wurfes spricht noch nicht für die Gleichheit der chemischen Prozesse, die in den Zentren des Gehirns ablaufen, weil diese chemischen Prozesse in beträchtlichem Ausmaße vom funktionellen Zustand der Nervenzentren abhängen* (Kätzchen Nr. 4 und 5). *Obgleich die Reizungen des Auges durch die Lichtstrahlen im Verlauf der ersten Tage ausreichend sind, um die Intensität der Proteolyse in den Sehzentren zu erhöhen, so ist aber auch diese selbe Frist ausreichend, um nach Ausschließung des Lichtzutritts zur Netzhaut diese von neuem stark herabzusetzen* (Kätzchen Nr. 7 und 8).

Die Intensität der proteolytischen Prozesse und zugleich mit ihnen möglicherweise auch die Intensität anderer Stoffwechselprozesse in

den Nervenzellen und Fasern änderte sich in Abhängigkeit vom funktionellen Zustand dieser Zellen und Fasern. Der Übergang von der physiologischen Ruhe zur physiologischen Arbeit und umgekehrt von der Arbeit zur Ruhe wurde ohne Anwendung irgend einer starken Einwirkung erreicht. Hier wurden nicht chemisch fremde, nicht ungewöhnlich starke physische Mittel angewandt. Hier wurde bloß die Wirkung gewöhnlicher Lichtstrahlen auf die Netzhaut oder die Verhinderung ihres Zutritts zu dieser untersucht. Die Versuchsanordnung verursachte keinerlei schwere Veränderungen im Nerven oder den Zellen, da schon nach einer so kurzen Frist, wie 15 Minuten, eine vollkommene Rückkehr der Intensität der proteolytischen Prozesse zur vor dem Versuch herrschenden Norm stattfand (Versuch 31). Die Veränderungen in der Intensität der Proteolyse bei den Katzen mit den vernähten Augenlidern gegenüber den sehenden kann nicht auf die Rechnung einer geänderten Blutversorgung des zur Ruhe gebrachten Abschnitts gesetzt werden, denn in diesem Falle hätte man eine Veränderung in der grauen Rinden- und subkortikalen Substanz erwarten können, nicht aber in den optischen Bahnen, da die Nervenfasern vom Blut nur wenig versorgt werden und in hohem Grade von der Blutzufuhr unabhängig sind. Die Veränderungen im Reststickstoffgehalt dürfen nicht Schwankungen in der Blutfüllung der Zentren zugeschrieben werden, in der Voraussetzung, daß im Zusammenhang damit die veränderte Menge von Blutbeimischung zur Hirnsubstanz versehentlich als Änderung im Gehalt an Reststickstoff der Hirnsubstanz angesehen werden könnte. Da das Blut an Reststickstoff ärmer ist als das Gehirn, so hätte die Herabsetzung der Arbeit der optischen Zentren, die mit einer Verminderung seiner Blutfülle verbunden ist, eher von einer relativen Erhöhung des Reststickstoffgehalts als von einer Verminderung desselben, wie dies im Versuch der Fall war, begleitet sein müssen. Die Annahme, daß ungewohnte Lebensbedingungen der Tiere in den Käfigen auf das Gehirn hätten von Einfluß sein können, ist damit auszuschließen, daß sehende und nichtsehende Katzen ganz gleich und nicht selten auch dieselbe Zahl von Tagen gehalten wurden, weiter bliebe es in einem solchen Falle doch auch sehr sonderbar, daß die Änderungen der Proteolyse eben nur auf die optischen Zentren beschränkt waren, während sie in anderen Zentren unbeeinflußt blieb. Ebenso unrichtig wäre auch die Schlußfolgerung, daß nicht so sehr die Lichtreizung der Augen auf den Verlauf der chemischen Prozesse in den Sehzellen des Gehirns von Einfluß war, als vielmehr die starke Furcht des Tieres in den letzten Minuten seines Lebens, wie es aus dem Käfig in die Hand genommen wurde usw., da sich dies alle Tage beim Reinigen der Käfige und beim Füttern der Tiere wiederholte. Man darf auch nicht annehmen, daß der größere

oder geringere Schrecken bei den nichtsehenden Katzen gegenüber den sehenden hätte einen entsprechenden Einfluß eben auf die Sehzellen zeigen können. Unverständlich blieben in einem solchen Falle auch die Versuche an den Kätzchen.

In den angeführten Versuchen läßt sich also nur schwer die Möglichkeit sekundärer Nebeneinflüsse auf das Gehirn feststellen, und deshalb erscheinen sie als verhältnismäßig reine, experimentelle Untersuchungen des Einflusses einer Veränderung der funktionellen Zustände der Nervenzentren und Fasern auf die chemischen Prozesse, die in ihnen verlaufen. Lichtreizungen des Auges veranlassen unvermeidlich eine Verstärkung der Prozesse des Eiweißzerfalls in den Sehbahnen und Zentren. Die die Netzhaut reizenden Lichtstrahlen geben einen mächtigen Anstoß zur Verstärkung der Prozesse der Lebenstätigkeit in den entsprechenden Zentren und Bahnen. Die Veränderung des funktionellen Zustandes der Zellen und Fasern, des Übergangs vom Ruhein den Arbeitszustand und umgekehrt, ist unvermeidlich von einer Änderung in der Intensität der chemischen Prozesse begleitet. Auf diese Weise *werden nervöse Fortleitung und nervöse Assimilisation von einer Reihe chemischer Prozesse begleitet, insbesondere von Prozessen des Zerfalls von Eiweißstoffen*, was theoretisch schon längst anerkannt ist, erhält jetzt experimentelle Begründung. Die Änderung der chemischen Struktur der Nervenzellen und Fasern und ebenso die Änderungen der Intensität oder des Charakters der biochemischen Prozesse, die in ihnen verlaufen, sind unzertrennlich mit einer Änderung ihrer Funktionen verbunden, einer Änderung, die vielleicht manchmal nicht konstant, vorübergehend, immer aber eindeutig bestimmt ist. *Die chemische Charakteristik der Nervenzellen und Fasern ist gleichzeitig auch ihre funktionelle Charakteristik.* Der Untersuchungsweg der chemischen Dynamik funktioneller Zustände der einzelnen Zentren führt zweifellos zum genauen Verständnis der funktionellen Bedeutung der einzelnen chemischen Bestandteile des Nervensystems und der verwickelten Summe ihrer chemischen Umwandlungsprozesse.

Über eine neue kolorimetrische Zuckerbestimmung.

Von

Ludwig Fábián.

(Aus der I. Abteilung des Weißen-Kreuz-Kinderspitals in Budapest.)

(Eingegangen am 14. September 1926.)

Bei der quantitativen Zuckerbestimmung wird die reduzierende Eigenschaft des Zuckers derart benutzt, daß die durch die Reduktion entstandene Menge des Cuprooxyds gravimetrisch (*Allihn*), titrimetrisch (*Fehling*, *Bertrand*) oder jodometrisch (*Bang*, *Schorl*, *Bruhns*) bestimmt wird. *Folin* und *Wu* arbeiteten eine noch einfachere kolorimetrische Methode aus, indem sie die Menge des Cuprooxyds aus der Farbenintensität der durch das Cuprooxyd zu Molybdänblau reduzierten Phosphormolybdänsäure feststellten. *Lorber* stellt ständige Vergleichslösung dar, indem er das Cuprooxyd in Cuproammoniumnitrat verwandelt und mit der bekannten Cupriammoniumsulfatlösung vergleicht.

Die folgende Zuckerbestimmungsmethode ist einfacher und kürzer (eine Bestimmung dauert 7 bis 8 Minuten und diese Zeit wird bei mehreren Bestimmungen noch deutlich verringert) als die vorhin genannten und von genügender Genauigkeit. Bei dieser Methode wird Kupferhydrocarbonatlösung bekannter Menge und Konzentration der reduzierenden Wirkung der Zuckerlösung ausgesetzt und die Menge des Zuckers wird aus der Farbenintensitätsänderung der Lösung nach Ausfällung des Cuprooxyds bestimmt. Zur Sicherung der vollständigen Reaktion wird das entstandene Cuprooxyd von KSCN in Cuprorhodanid verwandelt.

Die nötigen Reagenzien:

Ia. Die Standardlösung. 60 g K_2CO_3, 12 g $KHCO_3$ und 48 g KSCN werden in einem Erlenmeyerkolben (200 ccm) mit etwa 180 ccm destillierten Wassers auf einem Wasserbad (50 bis 60° C) gelöst und die Lösung wird von dem eventuell Unlöslichgebliebenen abfiltriert.

Ib. 0,9814 g des zweimal umkristallisierten $CuSO_4 . 5 H_2O$ werden in einigen Kubikzentimetern Wasser gelöst, langsam zur Lösung Ia gegossen, auf 200 ccm ergänzt und 20 Minuten lang in ein siedendes

Wasserbad gestellt. Nach dem Erkalten ist die Lösung in einer dunklen Flasche aufzubewahren.

II. Vergleichslösung. 8 ccm der Standardlösung werden in einem Probierglas mit 12 ccm Wasser verdünnt. Das Glas läßt man mit Watte zugestopft ungefähr eine Stunde lang stehen und füllt dann den Kolorimeterkeil. Im Keil luftdicht verschlossen, ist die Lösung monatelang haltbar, und nur wenn eine neue Standardlösung gefertigt wird, ist sie auszutauschen. 1 ccm der Lösung enthält 0,5 mg Kupfer.

Bestimmung. Man nimmt 0,6 — 0,6 ccm aus der mit destilliertem Wasser sechsfach verdünnten Traubenzuckerlösung in zwei gleichgroße *Wassermann*sche Röhren und gibt 0,4 — 0,4 ccm der Standardlösung dazu. Nach leichtem Zusammenschütteln werden die Röhren in ein siedendes Wasserbad (das gleichmäßige Sieden durch Zugabe kleiner Mengen Talkums gesichert) gesteckt und 4 Minuten lang darin gehalten. Bei Bestimmung eiweißhaltiger Zuckerlösungen werden die Eiweißstoffe gleichzeitig mit dem Verdünnen nach *Folin-Wu* ausgefällt. Man saugt ein Teil Blut in eine in $^1/_{100}$ ccm eingeteilte Pipette, läßt es in ein Zentrifugierrohr tropfen und spült es mit 3 Teilen Wasser nach. Nach Zugabe von einem Teile 10proz. Natriumwolframat und einem Teile $^2/_3$ n-Schwefelsäure, wird das Rohr mit einem Gummipfropfen verschlossen, sein Inhalt zusammengeschüttelt und stark zentrifugiert. 0,6 ccm der wasserklaren Flüssigkeit werden zur Bestimmung verwendet. Die erforderliche Blutmenge ist 0,3 ccm. Bei Reihenbestimmungen wird um die öfteren Venenpunktionen zu vermeiden, das Blut mit Hilfe des folgenden Apparats gewonnen. Ein Zentrifugierrohr wird mit einem zweimal durchgebohrten Kork versehen; in eine Bohrung wird eine unter 60° gebogene, in $^1/_{100}$ ccm eingeteilte Pipette eingesetzt (zwischen Ende der Pipette und Boden des Zentrifugierrohres ist etwa 2 cm Abstand), die andere Bohrung ist durch ein mit Sauggummi versehenes Glasrohr verbunden. Mit Hilfe dieses Apparats werden das Blut und die Reagenzien aufgesaugt. Die Bestimmung geschieht im *Autenriet*schen Kolorimeter. Die aus dem Zentrifugierrohr genommene Flüssigkeit wird in die Küvette eingefüllt und der Keil so lange bewegt, bis die Farbenintensität in beiden Seiten der Kolorimeteröffnung gleich ist. Es empfiehlt sich, den Mittelwert von drei bis vier Ablesungen zu benutzen. Da 1 ccm der Vergleichslösung 0,5 mg metallisches Kupfer enthält, welchem laut der Bestimmung 0,25 mg Zucker entsprechen bedeutet ein Skalenteil 0,0025 mg Zucker in $^1/_{10}$ ccm der zu bestimmenden Lösung. In 100 ccm wird man also den Zuckergehalt in Grammen ausgedrückt erhalten, wenn man die abgelesenen Skalenteile mit 0,0025 multipliziert oder mit 400 dividiert. Der Zuckergehalt der mehr als 0,25 Proz. Zucker enthaltenden Lösungen wird derart bestimmt, daß nach Ausfällen der Eiweißstoffe mit Wasser zwei- oder viermal verdünnt und das Resultat doppelt oder vierfach genommen wird. Um die Fehler zu beseitigen, welche aus den individuellen Ablesungen stammen, ist es empfehlenswert, daß man seinen Kolorimeterkeil auskalibriert, indem man eine genaue 1proz. Zuckerlösung bereitet, welche man auf das Drei-, Sechs- und Zwölffache verdünnt und in 0,6 — 0,6 ccm der Lösungen den Zuckergehalt bestimmt. Die Resultate auf eine Koordinatenachse gebracht, geben eine gerade Linie, von welcher der zu seinem Skalenteil gehörige Zuckerwert immer abgelesen werden kann.

Die Genauigkeit der Bestimmung wurde einerseits durch bekannte Zuckerlösungen, andererseits bei Blutzuckerbestimmungen parallel mit der *Folin-Wu*-Methode kontrolliert. Aus den zahlreichen Bestimmungen sollen hier die folgenden zwei Tabellen stehen:

Zuckerlösung.

Zuckergehalt		Differenz
wirklich Proz.	laut Bestimmung Proz.	Proz.
0,05	0,045—0,055	10—10
0,10	0,095—0,105	5— 5
0,15	0,145—0,155	3— 3
0,20	0,19 —0,21	5— 5

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist die Abweichung vom wahren Zuckergehalt unter 0,05 Proz. Zucker 10 Proz., über dieser Grenze 3 bis 5 Proz.

Blutzuckerbestimmung		Differenz
nach *Folin-Wu* Proz.	nach dieser Methode Proz.	Proz.
0,07	0,062	11,4
0,086	0,08	7,5
0,108	0,097	10,1
0,128	0,115	10,1
0,268	0,242	9,7

Also bekommen wir durchschnittlich um 10 Proz. kleinere Werte als mit *Folin-Wu*. Die Mittelwerte des Blutzuckers sind bei Säuglingen und Kindern 0,085 bis 0,105, die des Liquors 0,055 bis 0,075. Ungefähr 20 Bestimmungen wurden mit der *Bang*schen Methode kontrolliert, und die Resultate waren um 3 bis 4 Proz. kleiner.

Zusammenfassung.

Die oben angeführte kolorimetrische Zuckerbestimmung beruht auf der kupferreduzierenden Wirkung des Zuckers; sie ist von hinreichender Genauigkeit und ihre Anwendung wegen ihrer einfachen Ausführung hauptsächlich bei Reihenbestimmungen begründet.

Zur Frage der Entstehung des Antitrypsins.

Von

A. Niskowski.

(Aus dem Endokrinologischen Institut und dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 16. September 1926.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Zur Erklärung der Enstehung des Antitrypsins sind viele Theorien aufgestellt worden. Von ihnen hat nach Anzahl der Untersuchungen und Tiefe derselben am meisten die Theorie der Antikörperbildung gegen Trypsin Beachtung gefunden. Laut dieser ist das Antitrypsin ein Immunkörper, dessen Antigen das proteolytische Ferment Trypsin ist.

Künstlich kann man eine Anhäufung des Antitrypsins im Organismus auf verschiedene Weise hervorrufen. *Jochman* und *Kantorowicz*[1]) erhöhten den antitryptischen Index im Serum des Kaninchens um das 32fache, indem sie Pankreastrypsin oder Leucocytenferment in dasselbe einführten. *Braunstein* und *Kepinow*[2]) erhielten eine Erhöhung des antitryptischen Index durch intraperitoneale Einführung einer Emulsion von Leber und Krebszellen. *K. Meyer*[3]) vergrößerte den Antitrypsingehalt des Serums, indem er den Tieren Schilddrüsenauszug einführte. Selbständig häuft sich das Antitrypsin im Organismus bei einer großen Zahl von Erkrankungen an, die durch einen verstärkten Eiweißzerfall charakterisiert sind. Hierher gehören: Krebs, croupöse Pneumonie, Septicämie, Eiterungen, Mor. Basedowii, eiterige Endocarditis und viele andere.

Betreffs der Frage, welchen Ursprungs das Antigen ist, das eine Anhäufung des Antitrypsins hervorruft, gibt es zwei Meinungen. Einige Forscher, *K. Meyer*[4]), *Braunstein*[5]) und andere nehmen an, daß als Antigen dasjenige proteolytische Ferment in Betracht kommt, das aus den Zellen des Organismus bei ihrem Zerfall oder beim Zerfall der Leucocyten frei wird[6]).

Andere Autoren nehmen an, daß der Hauptlieferant des Antitrypsinantigens im Organismus das Pankreas sei [*Cobliner*[7]), *Stawraki*[8])]. Diese

---

[1]) *Jochman* und *Kantorowicz*, Zeitschr. f. klin. Med. **66**, Heft 1/2, 1908.
[2]) *Braunstein* und *Kepinow*, diese Zeitschr. **27**, 170, 1910.
[3]) *K. Meyer*, Fol. Serol. **7**, Abt. II; Berl. klin. Wochenschr. **28**, 1909.
[4]) *Derselbe*, Berl. klin. Wochenschr. **28**, 1909.
[5]) *Braunstein*, l. c.
[6]) *Eisner*, Zeitschr. f. Immunforsch. **1**, 650, 1909.
[7]) *Cobliner*, diese Zeitschr. **25**, 494, 1910.
[8]) *Stawraki*, Dissertation St. Petersburg, 1914.

Autoren gründen ihre Ansicht auf Experimente mit Entfernung des Pankreas bei Tieren. Es stellte sich heraus, daß unter diesen Bedingungen, das Antitrypsin des Serums, der Gewebe und Organe schnell abnimmt. Nach den Angaben *Stawrakis* ist die Abnahme nach 4 bis 16 Tagen nach der Operation gleich 78,4 Proz. im Mittel. Der Rest des Antitrypsins ist nach der Ansicht dieses Forschers eine Reaktion des Organismus auf ein Antigen nichtpankreatischen Ursprungs.

Die antitryptische Immunität unterscheidet sich durch einige Besonderheiten von dem, was man bei Anhäufung und Verschwinden von Immunkörpern beobachtet. Z. B. beobachtet man Anhäufung von Antitrypsin bei Einspritzung von Schilddrüsenextrakt oder Trypsin deutlich schon nach 24 Stunden, während die Anhäufung von Immunkörpern gewöhnlich viel später beobachtet wird. Ebenso schnell wie es sich im Organismus anhäuft, kann das Antitrypsin auch verschwinden. Die Untersuchungen von *Slatogorow* und *Scheremezinskaja*[1]) zeigten einen Abfall des antitryptischen Index von hohen Werten auf normale im Laufe von 2 Tagen bei croupöser Pneumonie. Ein so schnelles Verschwinden der Immunkörper ist gleichfalls ungewöhnlich, und diese Labilität der antitryptischen „Immunität" hat kein Analogon in der Immunitätslehre.

In der Arbeit *Stawrakis* ist der Gehalt an Antitrypsin in verschiedenen Organen der Tiere angegeben; hierbei wurde gefunden, daß derselbe in der Gl. submaxillaris um viele Male größer ist als in den anderen Organen.

Da ich in den existierenden Theorien keine erschöpfende und befriedigende Erklärung für die Entstehung des Antitrypsins fand und andererseits im Organismus ein Organ mit sehr großem Antitrypsingehalt kannte, stellte ich mir die Frage, ob nicht die *Speicheldrüse* das Organ ist, das das Antitrypsin ausscheidet.

An die Lösung dieser Frage ging ich mit der Methode *Krawkows* heran, indem ich die Speicheldrüse bei einem eben getöteten Hunde herausschnitt und dieselbe durch die Arterie mit *Ringer*scher Lösung im Apparat *Krawkows* speiste. Der Speichelgang wurde unterbunden und die Flüssigkeit, die sich aus den Venen und lymphatischen Gefäßen abschied, wurde gesammelt. Portionen dieser Flüssigkeit, die sich im Verlauf einer halben Stunde ansammelten, wurden auf Antitrypsin untersucht nach der Methode von *Gross-Fould*[2]).

Die ersten aus der Speicheldrüse erhaltenen Flüssigkeitsmengen ergaben den antitryptischen Index 0,2 bis 2,4. (Es wurden 46 Drüsen untersucht.)

---

[1]) *Slatogorow* und *Scheremezinskaja*, Wratscheb. Gas. 1912, Nr. 1 bis 4 (russ.).

[2]) Die aus der Drüse erhaltene Flüssigkeit ohne Zugabe von Caseinlösung gibt mit Essigsäure eine opaleszierende Trübung, auch wenn man sie mit Trypsin stehen läßt. Deswegen wurde als verdauende Trypsindosis diejenige Menge in Rechnung gezogen, bei welcher zuerst kein deutlicher dichter Caseinring mehr erhalten wurde, selbst wenn dieses Probierglas trüber war als das Kontrollglas ohne Casein.

Die anderen Organe des Hundes — dreimal die Nieren, zweimal Pankreas, Milz, Testes, unter denselben Bedingungen ausgewaschen — ergaben einen antitryptischen Titer der Waschflüssigkeit gleich Null.

Die Resultate dieser Untersuchung der antitryptischen Kraft in den halbstündigen Flüssigkeitsportionen gebe ich als Kurve wieder. Auf der Ordinate ist die Menge des Antitrypsins, auf der Abszisse — die durch die Drüse durchgeflossene Flüssigkeitsmenge in Kubikzentimetern aufgetragen. Die Entfernung zwischen zwei Punkten .—. entspricht einem halbstündigen Zeitintervall.

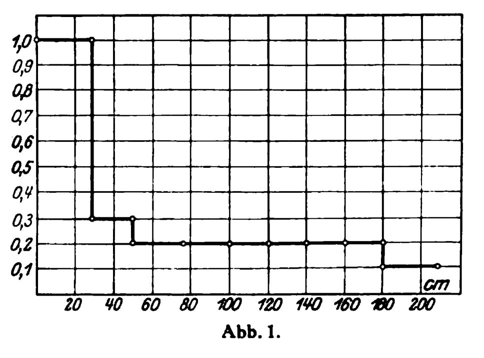


Abb. 1.

Abb. 1 zeigt die typische Kurve der antitryptischen Kraft der Flüssigkeit beim Durchströmen von reiner *Ringer*scher Lösung durch die Drüse.

Nachdem ich mich davon überzeugt hatte, daß die durch die Drüse fließende Flüssigkeit antitryptische Eigenschaften erwirbt, während andere Organe diese Eigenschaften der Flüssigkeit nicht erteilen, suchte ich nach Stoffen, deren Lösungen die Drüse anregen würden, Antitrypsin in erhöhten Mengen abzuscheiden.

Das erste, was ich versuchte, war eine Lösung von Trypsin (*Grübler*) in *Ringer*scher Lösung (1 : 5000, 10000, 20000). Die Kurven, die ich als Resultat der Versuche mit Trypsin bei fünf Drüsen erhielt, waren von demselben Typus, wie die in Abb. 1. Mithin ruft Trypsin unter diesen Versuchsbedingungen keine erhöhte Tätigkeit der Drüse hervor, und die antitryptische Kraft der Flüssigkeit fällt allmählich ebenso wie bei Durchwaschung der Drüse mit reiner *Ringer*scher Lösung.

In Anbetracht dessen, daß das Antitrypsin sich im Organismus bei solchen pathologischen Prozessen ansammelt, bei denen ein verstärkter Eiweißzerfall stattfindet, benutzte ich zum Durchwaschen der Drüse eine Aufschwemmung von Pepton-*Witte* in *Ringer*scher Lösung, einen Stoff, der die ersten Zerfallsprodukte des Eiweißes, Albumosen und Peptone enthält.

Die Kurve der antitryptischen Kraft der Flüssigkeit war nach Durchfluß der Drüse bei Peptonlösung (1 : 5000, 10000, 20000) dieselbe, wie bei reiner *Ringer*scher Lösung, s. Abb. 1. Die Beobachtung wurde an sieben Drüsen ausgeführt.

Darauf ging ich zu niedrigeren Zerfallsprodukten des Eiweißes über. Zu meiner Verfügung hatte ich nur die Dipeptide Leucyl-glycin und Alanyl-glycin.

Eine Lösung von Leucyl-glycin, die beim Durchfließen von fünf Drüsen beobachtet wurde, gab dieselbe abfallende Kurve für die antitryptische Kraft der Perfusionsflüssigkeit wie in Abb. 1.

Ganz anders als bei den vorhergehenden Versuchen verhielten sich die Drüsen, als in der *Ringer*schen Lösung Alanyl-glycin gelöst wurde.

Hier beobachtete man nach lange andauerndem Durchwaschen der Drüsen, als man überzeugt sein konnte, daß alle Vorräte von Antitrypsin in der Drüse, auch falls sie in derselben adsorbiert, schon ausgewaschen waren, ein scharfes Ansteigen der antitryptischen Kraft der Waschflüssigkeit. Abb. 2 gibt das Mittel aus Versuchen an vier

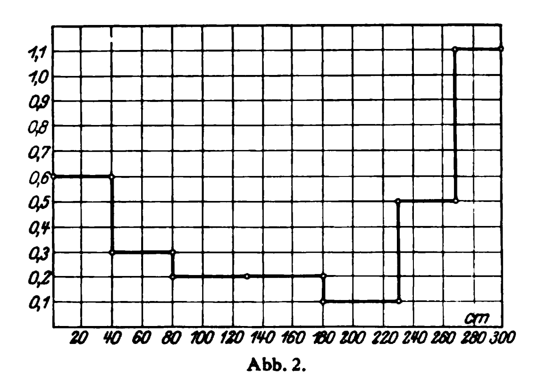


Abb. 2.

Drüsen wieder, die mit einer Lösung von Alanyl-glycin (1 : 10000) in *Ringer*scher Lösung durchgewaschen wurden. Wie man aus der Kurve sieht, fängt im Mittel nach $2\frac{1}{2}$ stündigem Durchwaschen der Drüsen die antitryptische Kraft der Waschflüssigkeit an zu steigen, um nach vierstündiger Arbeit der Drüsen die Anfangszahl um das Doppelte zu übersteigen.

Noch deutlicher ist der Einfluß des Alanyl-glycins auf die Drüse in Abb. 2a (Versuch 30). Hier ist nach dreistündigem Durch-

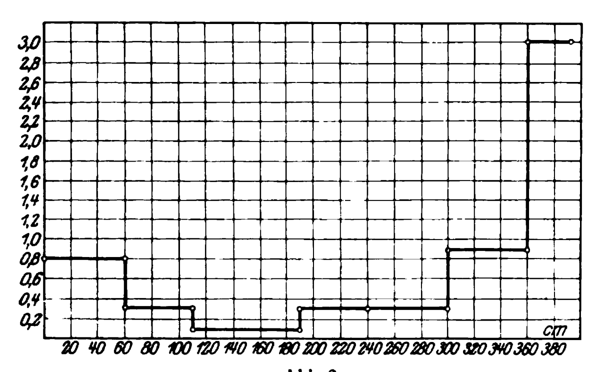


Abb. 2a.

waschen der Drüse mit Alanyl-glycinlösung die antitryptische Kraft der Flüssigkeit 3,7 mal größer als zu Beginn des Durchwaschens. Somit erlangt eine Lösung von Alanyl-glycin in *Ringer*scher Lösung beim Durchfließen der überlebenden Drüse eine bedeutende antitryptische Kraft.

Die Alanyl-glycinlösung selbst besitzt keine antitryptische Kraft, und diese Anhäufung von Antitrypsin konnte durch zweierlei Ursachen entstehen.

Entweder 1. die Drüsen produzieren Antitrypsin unter dem Einfluß von Alanyl-glycin und geben dasselbe an die durchfließende Flüssigkeit ab,

oder 2. irgend ein Eiweißstoff, der mechanisch aus der Drüse von der durchfließenden Flüssigkeit herausgewaschen wird, tritt mit dem Alanyl-glycin in Reaktion und als Resultat hiervon bildet sich ein Stoff, der antitryptische Kraft besitzt.

Letztere Erklärung mußte ich verwerfen, nachdem ich folgende Kontrollversuche angestellt hatte.

Reine *Ringer*sche Flüssigkeit, die durch die Drüse geflossen war und daher eine geringe antitryptische Kraft hatte (Flüssigkeit Nr. 1), wurde anna partes mit einer Lösung von Alanyl-glycin in *Ringer*scher Flüssigkeit (Flüssigkeit Nr. 2) gemischt und 4 bis 10 Stunden im Thermostaten stehengelassen. Der antitryptische Titer dieser Mischung erwies sich als halb so groß, wie der der Flüssigkeit Nr. 1. Folglich vergrößert ein Mischen und Stehenlassen der durch die Drüse gegangenen Flüssigkeit mit Alanyl-glycin die antitryptische Kraft dieser Flüssigkeit nicht[1]) und ich bleibe daher bei der ersten Erklärung.

Von den beiden von mir benutzten Dipeptiden Leucyl-glycin und Alanyl-glycin zeigte eine Wirkung nur das Alanyl-glycin, diese Wirkung kann man der Alaningruppe zuschreiben.

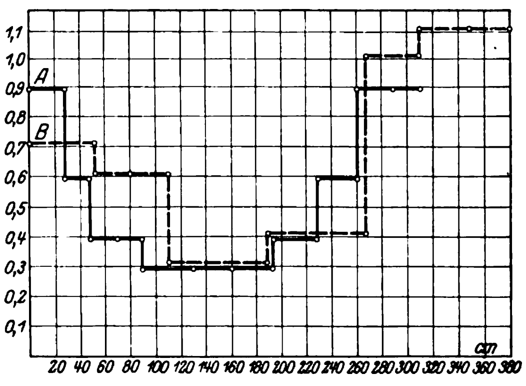


Abb. 3 a und b.

[1]) Die gleiche Kontrolle wurde mit den anderen Aminosäuren angestellt.

Mit α-Alanin habe ich Beobachtungen an sechs Drüsen angestellt. Die Messung der antitryptischen Kraft der erhaltenen Flüssigkeiten ergab die in Abb. 3a dargestellte Kurve. Sie ist eine mittlere Kurve, abgeleitet aus den Beobachtungen an sechs Drüsen beim Durchfließen von α-Alaninlösung (1 : 2500, 5000).

Noch deutlicher ist die Wirkung des Alanins auf die Drüse in Versuch 42 (Abb. 3b).

Hier begann die antitryptische Kraft der Flüssigkeit 3 Stunden nach Beginn des Durchwaschens der Drüse zu steigen und erreichte ein Maximum nach vierstündiger Arbeit.

Nachdem ich mich davon überzeugt hatte, daß Alanin ein Stoff ist, der die antitryptische Kraft der durch die Drüse laufenden Flüssigkeit erhöht, ging ich zur Untersuchung anderer, dem Alanin nach ihrer chemischen Struktur verwandter Stoffe über. Von solchen gelang es mir nur Tyrosin und Glutaminsäure zu erhalten.

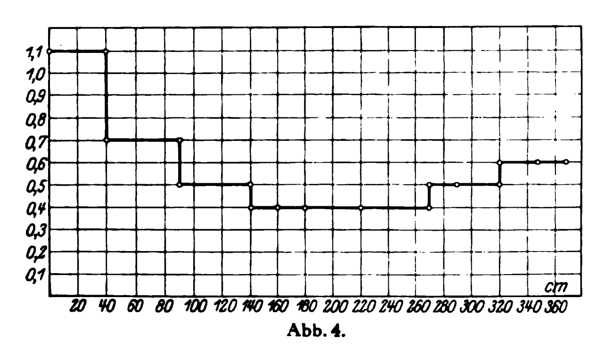


Abb. 4.

Mit Tyrosin (1 : 2500) wurden Versuche an zwei Drüsen angestellt. Die Kurven zeigen nur geringe Erhöhung der antitryptischen Kraft im Laufe der vierten Stunde der Drüsendurchwaschung. Abb. 4, Versuch 45.

Viel schärfer war der Einfluß auf die Drüse beim Durchlaufen einer Lösung von Glutaminsäure (1 : 5000), Abb. 5, Versuch 47. Hier war die antitryptische Kraft der Flüssigkeit in der fünften Arbeitsstunde höher als zu Beginn des Versuchs. Der Versuch mit Glutaminsäure wurde an zwei Drüsen durchgeführt.

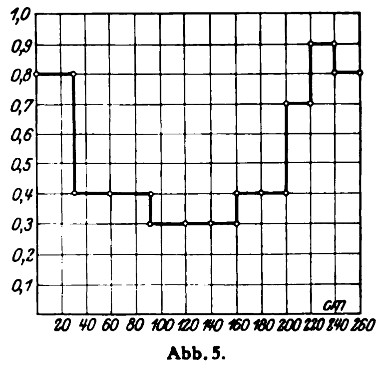


Abb. 5.

Außer den angeführten Aminosäuren habe ich untersucht: Arginin, Histidin und Carnosin.

Das Durchlaufen von Lösungen dieser Aminosäuren durch die Drüse hatte keinen Einfluß auf die antitryptische Kraft der die Drüse durchlaufenden Flüssigkeit, und die erhaltenen Kurven unterscheiden sich kaum von den Kurven für das Durchfließen von reiner *Ringer*scher Flüssigkeit, wie in Abb. 1.

Wenn ich meine bei diesen nicht sehr zahlreichen Versuchen erhaltenen Ergebnisse verallgemeinere, so könnte ich einige Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die Glandula submaxillaris des Hundes erteilt unter den beschriebenen Versuchsbedingungen der sie durchlaufenden Flüssigkeit antitryptische Kraft, während andere parenchymatische Organe (pancreas, lien. ren. testiculi) diese Eigenschaft nicht besitzen.

2. Trypsin ruft keine Konzentrationserhöhung der antitryptischen Kraft der die Drüse durchlaufenden Flüssigkeit hervor.

3. Eine Vergrößerung der antitryptischen Kraft in der, die Drüse durchlaufenden Flüssigkeit, tritt ein beim Durchfließen durch die Drüse einer Lösung von Alanin und von Stoffen, die die Alaningruppe enthalten (Alanyl-glycin, Tyrosin, Glutaminsäure).

4. Aminosäuren, welche in β-Stellung mehr oder weniger komplizierte chemische Gruppen enthalten, scheinen keine Erhöhung der antitryptischen Kraft in der die Drüse durchlaufenden Flüssigkeit hervorzurufen.

Um zu bestimmen, inwieweit der Antitrypsingehalt des Serums im lebenden Organismus von den Speicheldrüsen abhängt, habe ich an Hunden Experimente durchgeführt mit Exstirpation der Speicheldrüsen der Parotis, Submaxillaris, Sublingualis.

Die Beobachtungen wurden an drei Hunden angestellt (die Operationen wurden von Dr. *S. I. Tschetschulin* ausgeführt, wofür ich ihm meinen Dank ausspreche).

Hund A. Operiert am 22. Februar. Exstirpation der Drüsen auf beiden Seiten. Abb. 6[1]), Kurve *A* zeigt die Schwankungen des antitryptischen

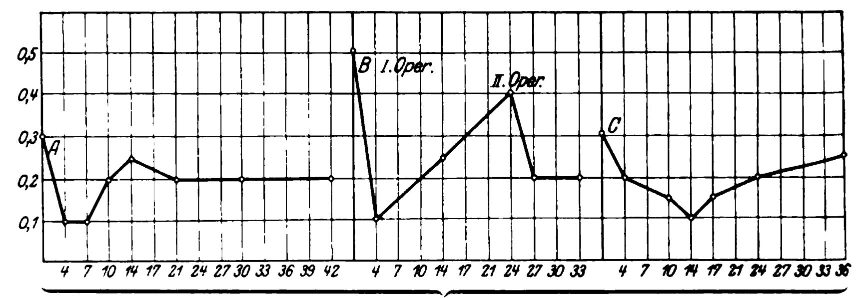


Abb. 6.

[1]) Ordinate = antitryptischer Index, Abszisse = Tage nach Operation.

Index im Serum. 2 Tage nach der Operation zeigte sich Eiterung der Wunde und Heilung erfolgte durch sekundäre Intention.

Das Antitrypsin des Serums fiel nach 4 Tagen von 0,3 auf 0,1, hielt einige Zeit auf diesem Niveau an, begann von neuem zu steigen, ohne jedoch im Laufe von mehr als einem Monat die anfängliche Höhe zu erreichen, trotzdem die Wunde lange Zeit eiterte. Am 5. April wurde das Tier getötet. Die Autopsie ergab bedeutende Überreste der G. sublingualis und der Parotis der linken Seite.

Hund B, Abb. 6, Kurve *B*. Operiert am 18. März 1926. Exstirpation der Parotis, Submaxillaris, Sublingualis der rechten Seite. Der antitryptische Index fiel von 0,5 in 7 Tagen auf 0,1 und stieg in den folgenden 20 Tagen auf 0,4. Am 12. April wurden die Drüsen der linken Seite exstirpiert. Der antitryptische Index fiel in 2 Tagen auf 0,2 und hielt sich auf diesem Niveau bis zum Tode des Tieres. Drüsenüberreste wurden bei der Autopsie nicht gefunden.

Hund C, Abb. 6, Kurve *C*. Am 13. Mai Exstirpation der Drüsen auf beiden Seiten. Prima intentio. Das Antitrypsin fiel im Laufe von 12 Tagen allmählich von 0,3 auf 0,1 und begann von neuem, langsam zu steigen, ohne jedoch in 20 Tagen die Ausgangsziffer zu erreichen.

Diese Experimente zeigen, daß Exstirpation der Speicheldrüsen bei Hunden ohne Zweifel den Antitrypsingehalt des Serums beeinflußt. Allein der antitryptische Index steigt im Laufe der Zeit von neuem, trotzdem er die Ausgangsziffer während der ganzen Zeit der Beobachtung nicht erreicht. Offenbar beginnen im Organismus irgendwelche Kompensationskräfte zu wirken, die den Organismus mit Antitrypsin versorgen. Eine Analyse der Kurve *B*, Abb. 6, zeigt, daß Entfernung der Drüsen auf einer Seite Verminderung des Antitrypsins auf 0,1 hervorruft, während die Exstirpation der verbliebenen Drüsen der anderen Seite den antitryptischen Index nur bis 0,2 erniedrigte und der Index sich auf dieser Höhe erhielt bis zum Tode des Tieres. Offenbar hatten in der Zeit zwischen den beiden Operationen die kompensatorischen Kräfte angefangen zu wirken.

Die Aufklärung der Frage, welche Antitrypsinquellen es im Organismus außer den großen Speicheldrüsen noch gibt, ist der Gegenstand meiner weiteren Untersuchungen. Es ist möglich, daß Hunde kein passendes Untersuchungsobjekt für dieses Experiment sind, weil sie einen mächtigen Speichelapparat besitzen, der bei der Wärmeregulation beteiligt ist, und außer den großen Speicheldrüsen noch eine Menge kleiner, im Schleimgewebe eingelagerter, der Exstirpation unzugänglicher Drüsen, welche die Arbeit des Speichelapparats übernehmen können.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

XV. Mitteilung:

Über die Beziehungen des Blutzuckerabbaues zur Blutgerinnung.

Von

Bernhard Stuber und **Konrad Lang.**

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 18. September 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Kernfrage, das Primum mobile des gesamten Gerinnungsprozesses, eindeutig zu klären, vermag heute noch keine der vielen Theorien der Blutgerinnung. Die Fermentlehre gibt die Antwort auf diese Frage in der Postulierung eines spezifischen Gerinnungsferments. So einfach diese Erklärung auf den ersten Blick scheint, so muß doch immer wieder betont werden, daß der Nachweis eines derartigen Ferments bis heute noch nie erbracht wurde. Deshalb sehen wir in der Fermentlehre mehr eine rein äußerliche Rubrizierung biologischer Vorgänge, aber keineswegs eine tiefergehende ursächliche Begründung derselben. Das sogenannte spezifische Gerinnungsferment als Axiom zu betrachten, wie das heute vielfach geschieht, lehnen wir nach wie vor ab. Näher darauf einzugehen, erübrigt sich hier, wir verweisen diesbezüglich auf unsere früheren Arbeiten.

Aber auch die physikalisch-chemischen Theorien des Gerinnungsvorgangs vermögen auf die eingangs gestellte Frage keine bindende Antwort zu geben. Je mehr man sich mit dem Gerinnungsproblem beschäftigt, um so auffallender erscheint die Zuhilfenahme immer komplizierterer Hypothesen zur Erklärung, warum das Blut eigentlich gerinnt. Das erweckt Zweifel an der Richtigkeit unserer Vorstellungen. Wir selbst haben bei unseren Arbeiten diese Frage immer im Auge behalten, aber erst in letzter Zeit glauben wir eine Deutung mit experimenteller Begründung dafür gefunden zu haben. Darüber soll im folgenden kurz berichtet werden.

Die bekannten Arbeiten von *Meyerhof* und *Warburg* führten uns zur genauen Orientierung über das Gebiet der Hämoglykolyse[1]). Dabei fiel uns die Tatsache auf, daß *alle* Substanzen, welche die *Blutglykolyse hemmen, in gleichem Sinne auch den Gerinnungsprozeß beeinflussen.* Das erschien uns für die Deutung des Gerinnungsprozesses besonders bemerkenswert. Irgend eine Beziehung zwischen Ablauf der Blutgerinnung und Zuckerzerstörung war damit diskutierbar. Wir bildeten uns die Vorstellung, daß die bei der Zuckerzerstörung im absterbenden Blute sich bildenden Säuren den physikalischen Zustand der Plasmaeiweißkörper nach deren Flockungsoptimum zu verschieben müßten. Es galt nun, den experimentellen Beweis für diese Anschauung zu erbringen. Das erschien um so verlockender, als hierfür exakte chemische und physikalische Methoden zur Verfügung stehen und damit die Unsicherheit aller bisher üblichen Arbeitsweisen zum Studium des Gerinnungsprozesses vermieden werden konnte.

Wir stellten zunächst den Grad der Glykolyse im frischen Blute und demselben Blute kurz vor der Gerinnung fest, und zwar gemessen an der Zuckerabnahme und Milchsäurezunahme.

Der Zucker wurde gravimetrisch nach *Allihn* bestimmt. Zur Enteiweißung wurde das Blut in die zehnfache Menge n/100 Essigsäure, die 1 Proz. Natriumacetat enthielt, eingetragen und aufgekocht. Nach dem Filtrieren wurde auf dem Wasserbad bis auf etwa 10 ccm eingeengt. Zurückgebliebene Spuren von Eiweiß flocken dabei noch aus. Das Filtrat wurde dann in der üblichen Weise behandelt. Für Plasma aus ungerinnbar gemachtem Blute erwies sich diese Enteiweißungsmethode ungeeignet, desgleichen Metaphosphorsäure und Trichloressigsäure. Das Eiweißkoagulum ist zäh und klebrig, filtriert infolgendessen sehr schlecht. Dadurch sind Zuckerverluste unvermeidlich. In diesem Falle zeigte sich die *Bang*sche Uransalzlösung am zweckmäßigsten. Das Plasma wurde mit der zehnfachen Menge der Salzlösung kurz aufgekocht, es bildet sich ein grobflockiger Niederschlag, der rasch abfiltriert. Die verwendete Blutmenge betrug 10 ccm. Das Blut wurde Tieren (Kaninchen und Hunden) mit paraffinierter Kanüle unter allen Kautelen aus der Carotis entnommen und die entsprechende Menge sofort in die Enteiweißungslösung eingebracht. Die gleiche Menge Blut wurde so lange stehengelassen, bis eben die Gerinnung anfing, dann wurde in gleicher Weise enteiweißt. Die Zeit bis zum Beginn der Gerinnung lag in allen Versuchen zwischen 10 und 15 Minuten.

Die Milchsäurebestimmungen wurden nach der Methode von *Meyerhof*[2]) und *Hirsch-Kaufmann*[3]) durchgeführt, nur mit dem Unterschied, daß wir zur Enteiweißung, wie *Mendel* und *Goldscheider*[4]) bei ihrer kolorimetrischen Bestimmung, Methaphosphorsäure gebrauchten. Zucker und Milchsäure

---

[1]) *M. Bürger*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **31**, 1923 (dort weitere Literatur).

[2]) *Meyerhof*, Pflügers Arch. **204**, 1924.

[3]) *Hirsch-Kaufmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **140**, 1924.

[4]) *Mendel* und *Goldscheider*, diese Zeitschr. **164**, 163, 1925.

wurden immer zu gleicher Zeit bestimmt. In allen Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Genau in derselben Weise wurde mit Blut verfahren, dem die verschiedensten gerinnungshemmenden Mittel zugesetzt waren. Die Unterbrechung der Glykolyse durch Zufügen des Enteiweißungsmittels erfolgte in dem Moment der Gerinnung des zum Vergleich dienenden Nativblutes.

Wir geben im folgenden aus unseren zahlreichen Versuchen einige Beispiele wieder.

Tabelle I.

Blutzuckerabnahme während der Gerinnung, auf je 10 ccm Blut berechnet.

Zucker sofort bei der Blutentnahme mg	Zucker beim Beginn der Gerinnung mg	Abnahme während der Gerinnung mg
25,9	24,9	1
12,0	10,6	1,4
14,2	12,3	1,9
15,3	12,6	2,7
14,2	12,0	2,2
14,7	8,9	5,8
18,0	16,9	1,1
15,3	12,6	2,7

Tabelle II.

Blutzuckerabnahme während der Gerinnung und bei Zugabe gerinnungshemmender Mittel, auf je 10 ccm Blut berechnet.

Zucker sofort bei Blutentnahme mg	Zucker beim Beginn der Gerinnung mg	Zucker nach Zusatz gerinnungshemmender Mittel mg		Abnahme	
				ohne Zusatz mg	mit Zusatz mg
14,2	8,9	Hirudin	12,6	5,3	1,6
21,1	19,4	„	20,7	1,7	0,4
21,3	20,5	NaF	21,2	0,8	0,1
6,6	3,6	„	4,3	3,0	2,3
21,7	19,7	„	21,1	2,0	0,6
13,2	9,6	„	10,5	3,6	2,7

Tabelle I zeigt, daß während der Gerinnung Zucker verschwindet, und daß durch *Zusatz gerinnungshemmender Mittel*, wie aus Tabelle II zu entnehmen ist, die Zuckerzerstörung, wenn auch nicht aufgehoben, so doch *wesentlich zurückgedrängt wird.* Dabei ist zu beachten, daß die Versuchsdauer sehr kurz, 10 bis 15 Minuten, ist. Bei länger dauernden Versuchen sind bekanntermaßen die Unterschiede wesentlich größer. Bei unserer Fragestellung bezüglich des Gerinnungsproblems kamen derartige Versuche jedoch nicht in Betracht.

In ähnlicher Weise verliefen die Untersuchungen mit Bestimmung der Milchsäure, worüber die folgende Tabelle III Aufschluß gibt.

Tabelle III.

Blutmilchsäurezunahme während der Gerinnung und bei Zugabe gerinnungshemmender Mittel, auf je 10 ccm Blut berechnet.

Milchsäure sofort bei Blutentnahme mg	Milchsäure beim Beginn der Gerinnung mg	Milchsäure nach Zusatz gerinnungshemmender Mittel mg	Zunahme ohne Zusatz mg	Zunahme mit Zusatz mg
1,9	4,8	NaF 2,7	2,9	0,8
2,3	4,1	„ 3,6	1,8	1,3
2,1	3,2	Oxalat 2,2	1,1	0,1
1,0	2,3	„ 1,4	1,3	0,4
1,7	2,6	„ 2,5	0,9	0,8
2,0	3,0	„ 2,8	1,0	0,8
2,0	2,6	Hirudin 2,8	0,6	0,8
0,9	1,6	„ 1,6	0,7	0,7
1,6	—	$MgSO_4$ 2,7	—	1,1

Die Versuche zeigen, daß während der Gerinnung die *Blutmilchsäure deutlich zunimmt. Gerinnungshemmende Mittel setzen die Milchsäurebildung herab,* jedoch nicht generell, beim Hirudinblut bleibt sie unverändert bestehen. Daß die während der Gerinnung eintretende Blutsäuerung das CO_2-Bindungsvermögen vermindern muß, ist ohne weiteres einleuchtend. Bestimmungen der Alkalireserve des Gesamtblutes nach *van Slyke* ergaben im Mittel aus mehreren Versuchen direkt nach der Blutentnahme 51,86 Vol.-Proz. CO_2, nach 10 Minuten, also kurz vor der Gerinnung 49,03 Vol.-Proz. CO_2.

Die folgenden Untersuchungen in Tabelle IV und V orientieren über Bilanzversuche am Gesamtblut und Oxalatplasma.

Die Versuche bestätigen die bisherigen Ergebnisse. Bringt man *Oxalatplasma durch Kalkzusatz zum Gerinnen,* so *nimmt entsprechend auch die Glykolyse zu,* wie aus Tabelle V zu entnehmen ist. Das ist auch bei Plasma der Fall, das 2 Stunden bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert wurde, also als plättchenfrei angesprochen werden muß.

Verhindert man im nativen Plasma durch Eiskühlung die Gerinnung und läßt durch Erwärmen letztere wieder eintreten, so ergibt sich ebenfalls eine deutliche Glykolyse während der Gerinnung, im Gegensatz zum eisgekühlten, ungeronnenen Plasma (siehe letzter Versuch in Tabelle V).

In allen Bilanzversuchen wird jedoch die während der Gerinnung eintretende Zuckerabnahme durch den Milchsäurezuwachs nicht gedeckt. Es bleibt vielmehr ein *Defizit.* Letzteres könnte in dem Auftreten synthetischer Prozesse gelegen sein. Wir prüften deshalb, ob während der Gerinnung ein Zuwachs an Glykogen nachweisbar ist. Die Glykogenbestimmungen in etwa 50 ccm Blut wurden nach *Pflüger* durchgeführt.

Tabelle IV. Bilanzversuche am Gesamtblut.
Blutzuckerabnahme und Milchsäurezunahme während der Gerinnung und nach Zugabe gerinnungshemmender Mittel, berechnet auf je 10 ccm Blut.

Sofort bei der Blutentnahme: Zucker mg	Sofort bei der Blutentnahme: Milchsäure mg	Zucker in mg: mit Zusatz		Zucker in mg: Gerinnungsbeginn Kontrolle ohne Zusatz	Milchsäure in mg: mit Zusatz		Milchsäure in mg: Gerinnungsbeginn Kontrolle ohne Zusatz	Differenz: Zuckerabnahme in mg: mit Zusatz		Differenz: Zuckerabnahme in mg: ohne Zusatz	Differenz: Milchsäurezunahme in mg: mit Zusatz		Differenz: Milchsäurezunahme in mg: ohne Zusatz
6,6	1,9	NaF	4,3	3,6	NaF	2,7	4,8	NaF	2,3	3,0	NaF	0,8	2,9
21,7	6,0	"	21,1	19,7	"	6,0	6,5	"	0,6	2,0	"	0,0	0,5
13,2	2,3	"	10,5	9,6	"	3,6	4,1	"	2,7	3,6	"	1,3	1,8
13,8	1,3	„Bayer 205"	13,8	12,2	„Bayer 205"	1,7	2,1	„Bayer 205"	0,0	1,6	„Bayer 205"	0,4	0,8
8,5	1,6	Hirudin	7,8	5,1	Hirudin	4,0	4,3	Hirudin	0,7	3,4	Hirudin	2,4	2,7
15,2	2,3	Citrat	15,2	11,4	Citrat	2,0	3,2	Citrat	0,0	3,8	Citrat	0,4	0,9

Tabelle V. Bilanzversuche am Oxalatplasma (3 prom.).
Blutzuckerabnahme und Milchsäurezunahme im Oxalatplasma und während der Gerinnung desselben nach $CaCl_2$-Zusatz, berechnet auf je 10 ccm Plasma.

Oxalatplasma: Zucker mg	Oxalatplasma: Milchsäure mg	Zucker: im Beginn der Gerinnung nach $CaCl_2$-Zusatz mg	Zucker: ohne Zusatz mg	Milchsäure: im Beginn der Gerinnung nach $CaCl_2$-Zusatz mg	Milchsäure: ohne Zusatz mg	Differenz: Zuckerabnahme: nach $CaCl_2$-Zusatz mg	Differenz: Zuckerabnahme: ohne Zusatz mg	Differenz: Milchsäurezunahme: nach $CaCl_2$-Zusatz mg	Differenz: Milchsäurezunahme: ohne Zusatz mg
23,2	3,9	22,0	22,5	5,5	4,3	1,2	0,7	1,6	0,4
34,5	6,4	34,1	34,4	6,8	6,4	0,4	0,1	0,4	0,0
31,9	0,7	24,9	25,8	1,5	1,4	7,0	6,1	0,8	0,7
Nativplasma, aber eisgekühlt		gerinnend		gerinnend		während der Gerinnung		während der Gerinnung	
20,1	1,4	16,3	—	1,7		3,8		0,3	

Die Bestimmungen erfolgten direkt nach Entnahme des Blutes und im Beginn der Gerinnung. Als Kontrolle diente Fluoridblut in gleichen zeitlichen Abständen. Die Tabelle VI gibt die Resultate wieder.

Tabelle VI.

Verhalten des Glykogens während der Gerinnung, auf je 10 ccm Blut berechnet.

Glykogen sofort bei der Blutentnahme mg	Glykogen während der Gerinnung mg	Glykogen im Fluoridblut mg	Zu- bzw. Abnahme Nativblut mg	Zu- bzw. Abnahme Fluoridblut mg
1,9	2,3	1,2	+ 0,4	— 0,7
0,0 *)	0,0	0,7	0,0	+ 0,7
0,4	0,7	0,5	+ 0,3	+ 0,1
0,15	0,2	0,15	+ 0,05	0,0

*) Das Tier hatte zwei Tage gehungert.

Wir finden minimale Zunahme, aber ebenso auch Gleichbleiben der Glykogenwerte während des Gerinnungsprozesses. Das nicht gerinnende Fluoridblut zeigte sogar den größten Glykogenzuwachs. Eine Erklärung für das Defizit konnte daraus jedenfalls nicht gegeben werden. Da auch die direkte Säurehydrolyse des Blutes vor und während der Gerinnung keinen Zuwachs an reduzierenden Substanzen aufwies, mußte der Gedanke, die oben erwähnte Differenz in synthetischen Prozessen zu suchen, fallen gelassen werden. Damit war nur noch die Möglichkeit gegeben, das ursächliche Moment in einem weiteren Abbau der Milchsäure, also in *oxydativen Prozessen* zu suchen. Wir bestimmten deshalb die Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe im Plasma während der Gerinnung. Als Plasma diente natives, eisgekühltes Plasma, das während des Versuchs durch allmähliche Erwärmung spontan gerann bzw. solches, in dem durch Zufügen der verschiedensten gerinnungshemmenden Mittel die Gerinnung aufgehoben war. In verschiedenen Untersuchungen wurde während des Versuchs, soweit die entsprechenden Plasmas dafür geeignet waren, die Gerinnung durch Kalkzusatz wieder ausgelöst. Wir gebrauchten absichtlich für diese Gasuntersuchungen nur Plasma, da wir von vornherein vermuteten, daß bei Verwendung von Blut das Oxyhämoglobin störend wirkt. Vorversuche ergaben auch durchaus schwankende Werte. Nach den Untersuchungen von *Warburg*[1]), *Onaka*[2]) und *Morawitz*[3]) ist das verständlich. Wissen wir doch seither, daß die korpuskulären Elemente des Blutes eine sehr lebhafte und individuell schwankende Atmung

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 1909; **69**, 1910.

[2]) Ebendaselbst **71**, 1911.

[3]) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Pharm. **60**, 1909; Deutsch. Arch. f. klin. Med. **100**, 1910.

zeigen, die durch Zugabe gerinnungshemmender Mittel noch gesteigert werden kann.

Zur Durchführung der Gasanalysen konstruierten wir uns eine Apparatur, die in Abb. 1 abgebildet ist.

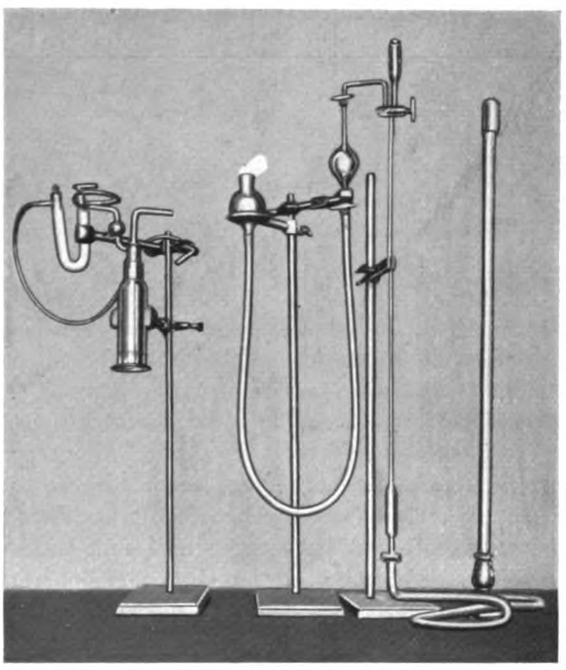


Abb. 1.

Dieselbe besteht aus einer dickwandigen, kugeligen Glasbürette von etwa 50 ccm Fassungsraum, die oben und unten durch einen Hahn abgeschlossen werden kann. Das untere Ende wird durch einen Schlauch mit einem Quecksilberreservoir verbunden. Das obere Ende der Bürette kommuniziert durch eine Glaskapillare durch Schlauchverbindung mit der Glaskapillare einer Mikrogasbürette. Letztere hat bis zu ihrem erweiterten Ende ein Fassungsvermögen von 5 ccm. Sie trägt am oberen Ende einen doppelt durchbohrten Hahn, der einerseits die Verbindung mit der kugeligen Bürette, andererseits mit einem Aufsatz herstellt. Die Mikrogasbürette, die noch genaues Ablesen bis in die dritte Dezimale gestattet, steht an ihrem unteren erweiterten Ende, wie aus der Abbildung ersichtlich, mit einer Quecksilberbürette in Verbindung. Bei Beginn des Versuchs wird die Mikrobürette durch Senken des Quecksilbers von dem Aufsatz aus mit n/50 Barytlauge gefüllt. Etwa eingedrungene Luft wird nach Lösen der Gummiverbindung an der Kapillare durch Heben des Quecksilbers und nach Umstellung des doppelt durchbohrten Hahnes entfernt. Dann wird die Glaskapillare der Mikrobürette mit zwei hintereinander geschalteten Waschflaschen verbunden, von denen die eine 60proz. Kalilauge, die andere

Natronkalk enthält. Durch Senken des Quecksilbers wird die Mikrogasbürette mit völlig kohlensäurefreier Luft gefüllt. Nun wird die kugelige Bürette mit Plasma beschickt (10 ccm). Man läßt zu diesem Zwecke aus dem Quecksilberreservoir so viel Quecksilber einfließen, daß die Bürette zur Hälfte gefüllt ist. Auf das Quecksilber wird das Plasma eingefüllt. Zur bequemeren Einfüllung des Plasmas haben wir in letzter Zeit an der Bürette seitlich noch einen eingeschliffenen Hahn anbringen lassen (in der Abbildung nicht dargestellt). Dann wird durch Heben des Quecksilberreservoirs das Plasma bis zum Ende der Kapillare geführt, um die gesamte Luft zu entfernen. Nachdem dies geschehen, wird die Schlauchverbindung mit der Kapillare der Mikrogasbürette hergestellt, so eng, daß beide Kapillaren aufeinanderstoßen. Nach Senken des Quecksilberreservoirs und Öffnen des Gasbürettenhahns fließt nun die kohlensäurefreie Luft unter Zurückströmen des Plasmas in die Bürette ein. Man läßt nun die Luft quantitativ einlaufen, bis entsprechend die Barytlauge in der Mikrogasbürette bis zur Kapillare vorgedrungen ist. Durch vorsichtiges Schaukeln des Glasbehälters sorgt man für gute Durchmischung. Nach beendeter Gerinnung wird durch Heben des Quecksilberreservoirs das geronnene Plasma nach der Kapillare zu getrieben. Das austretende Serum erleichtert das quantitative Überführen des Gasgemisches in die Gasbürette. Durch lebhaftes Schütteln der Gasbürette wird die gebildete Kohlensäure von der Barytlauge absorbiert. Die Volumenabnahme ergibt den Sauerstoffverbrauch. Durch Titration der Barytlauge nach erfolgter Absorption mit n/50 HCl erhält man die Werte der gebildeten Kohlensäure. Die Berechnungen erfolgen nach den bekannten Regeln der Gas- und Titrationsanalyse, auf die hier nicht näher eingegangen zu werden braucht. Sämtliche Messungen wurden bei 19 bis 20° C durchgeführt.

In der folgenden Tabelle VII geben wir Versuche mit nativem Plasma wieder. Die Gerinnung wurde durch Eiskühlung verhindert. Nach Einbringung des Plasmas in den Apparat trat durch allmähliche Erwärmung spontane Gerinnung ein.

Tabelle VII.
Gasversuche mit je 10 ccm nativem Plasma.
O_2- und CO_2-Werte in Milligrammen.

Plasma von	Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2
Kaninchen . . .	0,40	0,35
" . . .	0,25	0,53
" . . .	0,15	0,15
" . . .	0,26	0,16
" . . .	0,13	0,12
Hund	0,44	0,39
Mittelwerte . . .	0,27	0,28

In den nachstehenden Tabellen finden sich Versuche von Plasma, dem gerinnungshemmende Mittel zugesetzt waren. Die Versuchsdauer entsprach der Gerinnungszeit des recalcifizierten Plasmas. Beim Oxalat- und Citratplasma wurde die Gerinnung durch Kalkzusatz in

der Weise ausgelöst, daß in den Apparat durch den seitlich eingeschliffenen Hahn kohlensäurefreie, über Paraffin stehende, 5proz. $CaCl_2$-Lösung eingefüllt wurde.

Tabelle VIII.

Gasversuche mit je 10 ccm Oxalatplasma direkt und nach $CaCl_2$-Zusatz. O_2- und CO_2-Werte in Milligrammen.

Plasma vom		Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2		Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2
Kaninchen . . .	direkt	0,0	0,09	nach $CaCl_2$-Zusatz	0,31	0,34
" . . .		0,0	0,27		0,19	0,35
" . . .		0,0	0,22		0,19	0,31
" . . .		0,0	0,10		0,15	0,37
" . . .		0,0	0,01		0,22	0,13
Hund		0,0	0,18		0,60	0,36
"		0,0	0,08		0,44	0,39
Mittelwerte . . .		0,0	0,13 *)		0,26	0,28

*) Die geringe Menge von Kohlensäure, die sich trotz fehlenden Sauerstoffverbrauchs in den Gasversuchen im nicht gerinnenden Plasma nachweisen ließ, bezieht sich nicht etwa auf Abgabe von im Plasma präformiert vorhandener Kohlensäure, da Kohlensäurebestimmungen nach *van Slyke* in frischem Oxalatplasma und solchem, das 10 bis 15 Minuten im Apparat mit CO_2-freier Luft in Berührung war, die gleichen Werte ergaben. Unsere Untersuchungen ergaben ja auch im nicht gerinnenden Blute eine, wenn auch sehr abgeschwächte, Milchsäurezerstörung. Letztere könnte unter diesen Bed ngungen durch den Einfluß der gerinnungshemmenden Mittel ohne Sauerstoffverbrauch in anderer Richtung als in der Norm verlaufen. Wir denken z. B. an die Bildung von kleinen Mengen Äthylalkohol. Darüber müssen weitere Untersuchungen entscheiden.

Tabelle IX.

Gasversuche mit je 10 ccm Citratplasma direkt und nach $CaCl_2$-Zusatz. O_2- und CO_2-Werte in Milligrammen.

Plasma vom		Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2		Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2
Kaninchen . . .	direkt	0,0	0,13	Nach $CaCl_2$-Zusatz	?	0,20
" . . .		0,0	0,22		0,45	0,25
" . . .		0,0	0,12		0,32	0,22
Mittelwerte . . .		0,0	0,16		0,36	0,23

Tabelle X.

Gasversuche mit je 10 ccm Plasma (Kaninchen) unter Zusatz gerinnungshemmender Mittel. Versuchsdauer 12 Minuten. O_2- und CO_2-Werte in Milligrammen.

Plasma	Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2
Hirudinplasma	0,0	0,03
"	0,0	0,06
Mittelwerte	0,0	0,05

Tabelle X (Fortsetzung).

Plasma	Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2
Fluoridplasma	0,0	0,05
„	0,0	0,28
„	0,0	0,16
„	0,0	0,07
Mittelwerte	0,0	0,14
„Bayer 205"-Plasma *) . .	0,0	0,10
„ „ . . .	0,0	0,04
„ „ . . .	0,0	0,00
Mittelwerte	0,0	0,05
$MgSO_4$-Plasma	0,04	0,02
„ „	0,19	0,18
„ „	0,00	0,18
Mittelwerte	0,08	0,13

*) Für die Überlassung von „Bayer 205" (Germanin) sind wir der I. G. Farbenindustrie A.-G in Leverkusen zu Dank verpflichtet.

Daß die Plasmaatmung nicht etwa durch noch beigemengte Blutplättchen bedingt ist, zeigt der Versuch der Tabelle XI. Oxalatplasma wurde nach *Morawitz* fraktioniert zentrifugiert. Das letzte Zentrifugat war 2 Stunden bei 3500 Umdrehungen in der Zentrifuge.

Tabelle XI.
Gasversuche mit Oxalatplasma nach $CaCl_2$-Zusatz.
O_2- und CO_2-Werte in Milligrammen.

Aufgenommener O_2	Abgegebene CO_2
0,13	0,18
0,31	0,25
0,12	0,18
Mittelwerte: 0,19	0,20

Ein derartiges Plasma zeigt auch eine deutliche Glykolyse, so betrug der Anfangszuckerwert 0,321 Proz., nach mehrstündigem Zentrifugieren sank dieser Wert im plättchenfreien Plasma auf 0,314 Proz., in dem durch Kalkzusatz gerinnenden Plasma fiel der Zucker weiter bis auf 0,308 Proz. Die beiden letzten Bestimmungen wurden natürlich zu gleichen Zeiten durchgeführt.

Überblickt man die an Plasma angestellten Gasversuche, so zeigt sich in allen Untersuchungen übereinstimmend eine *Atmung des Plasmas*, wenn auch in weit geringerem Ausmaß als sie vom Gesamtblut her bekannt ist, sie ist vor allem auch deutlich nachweisbar in *völlig zellfreiem* Plasma. Das ist verständlich, nachdem von *Meyerhof* in neuen

Untersuchungen[1]) gezeigt werden konnte, daß ein Teil der in dem Zymasekomplex vorhandenen Fermentgruppen von der Zelle abgetrennt werden kann, also nicht strukturgebunden ist. Von Teilfermenten des oxydativen Zuckerabbaues ist das schon länger bekannt. Die in unseren Versuchen nachgewiesene Glykolyse und oxydative Zuckerzerstörung auch im zellfreien Plasma war deshalb von vorherein zu erwarten, um so mehr, als die mit der Abtrennung des Plasmas notwendigerweise verbundenen Manipulationen auch bei größter Vorsicht eine Schädigung der korpuskulären Blutelemente nicht vermeiden lassen. Erstaunlich ist es, wie *rasch* in wenigen Minuten nach Entnahme des Blutes schon die Endprodukte des Zuckerabbaues im absterbenden Blute nachweisbar sind. Bei der großen Empfindlichkeit der fermentativen Vorgänge beim Zuckerabbau gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen waren völlig konforme Ergebnisse nicht zu erwarten. Dazu kommen noch individuelle Verschiedenheiten bezüglich des Vorkommens des glykolytischen Ferments, ferner die Abhängigkeit der Glykolyse von der Höhe des Blutzuckerspiegels. Das sind alles modifizierende Faktoren, die bei den Gerinnungsversuchen am absterbenden Blute wenig durchsichtig sind, und bei der Vielseitigkeit der sich vielfach gegenseitig beeinflussenden biologischen Prozesse in einem so komplizierten kolloidalen System wie Blut bzw. Plasma trotz aller Sorgfalt in den einzelnen Versuchen niemals einander gleichgestaltet werden können. Vergleichbare Resultate können sich deshalb nur aus Mittelwerten von Reihenversuchen ergeben.

Überblicken wir die bisher geschilderten Versuche, so zeigt sich im allgemeinen eine deutliche *Hemmung* der Glykolyse des Blutes durch Zufügung *gerinnungshemmender Mittel* schon in der *kurzen* Versuchsdauer, die der durchschnittlichen Gerinnungszeit des Blutes entspricht. Der maßgebende Faktor bei der Gerinnungshemmung durch diese Substanzen erscheint die Zurückdrängung der anaeroben Phase des Zuckerabbaues nicht zu sein. Das wird sofort einleuchtend, wenn man die Ergebnisse der Plasmagasversuche in den Tabellen VII bis X betrachtet. Hier fällt die *völlige Aufhebung der Plasmaatmung durch Zugabe der gerinnungshemmenden Mittel auf.* Leitet man den Gerinnungsprozeß in einem derartigen Plasma durch *Kalkzusatz* wieder ein, so *tritt sofort Sauerstoffaufnahme ein*, und zwar erreicht die *Atmung dann wieder dieselbe Größe wie im nativen, spontan gerinnenden Plasma.* Die Wirkung der gerinnungshemmenden Mittel auf das Plasma verläuft also entgegengesetzt derjenigen auf die korpuskulären Elemente. In dieser völligen *Aufhebung der oxydativen Phase* des Zuckerabbaues sehen wir die wesentliche Ursache der Sistierung der Blutgerinnung

[1]) Naturwissenschaften, H. 10, März 1926.

durch gerinnungshemmende Mittel. In dieser ***Rehabilitierung der Plasmaatmung durch Kalkzusatz*** erblicken wir nicht nur eine Entfernung des gerinnungshemmenden Mittels, also ein rein chemisches Geschehen, sondern auch eine Änderung des kolloidalen Zustandes der Eiweißkörper. Wissen wir doch durch die *Warburg*schen Arbeiten, daß biologische Oxydationen zum optimalen Verlauf vor allem geeignete Oberflächen benötigen. Wir finden darin eine weitere Bestärkung in der schon lange von uns vertretenen Anschauung, daß die gerinnungshemmenden Mittel an den Plasmaeiweißkörpern selbst angreifen.

Der von uns erbrachte Nachweis der *Bedeutung der aeroben Phase* des *Zuckerabbaues für den Ablauf des Gerinnungsprozesses* ließ, da eine Synthese nach den früher erwähnten Untersuchungen abzulehnen war, die Frage nach der Art der Abbauprodukte entstehen. Auf das Wesen dieses Prozesses schien uns aus den Gasversuchen ein bestimmter Schluß möglich, Betrachtet man das Verhältnis O_2 zu CO_2, so ist es nahezu immer etwa 0,9. Als Produkte des oxydativen Abbaues der Milchsäure schien uns Acetaldehyd, Ameisensäure und Essigsäure am wahrscheinlichsten. Die Berechnung des Verhältnisses O_2 zu CO_2 ergab sich aus den folgenden Formelbildern:

1. Bildung von Acetaldehyd:

$$CH_3.CH(OH).COOH + O \rightarrow CH_3.C\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown H\end{matrix} + CO_2 + H_2O$$

Quotient: $O_2 : CO_2 = 0{,}36$.

2. Bildung von Ameisensäure:

$$CH_3.CH(OH).COOH + 5\,O \rightarrow H.COOH + 2\,CO_2 + 2\,H_2O$$

Quotient: $O_2 : CO_2 = 0{,}91$.

3. Bildung von Essigsäure:

$$CH_3.CH(OH).COOH + 2\,O \rightarrow CH_3.COOH + CO_2 + H_2O$$

Quotient: $O_2 : CO_2 = 0{,}73$.

Die beste Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Gasversuche ergibt darnach die Annahme der Oxydation der Milchsäure über *Ameisensäure*. Eine Entstehung der Bernsteinsäure, die einen ähnlichen Quotienten liefert, schien uns nach den Daten der Literatur weniger wahrscheinlich. Wir gingen deshalb dazu über, Ameisensäurebestimmungen im Blute vor und während der Gerinnung durchzuführen. Zum Nachweis benutzten wir die Kalomelmethode nach den Angaben von *Riesser*[1]) und *Stepp*[2]). Über unsere Ergebnisse orientiert die Zusammenstellung der Tabelle XII.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**, 1916.
[2]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **134**, 1920.

Tabelle XII.

Ameisensäurebestimmungen im spontan gerinnenden, ferner im ungerinnbar gemachten und im recalcifizierten Blute. Die Werte in Milligrammen sind auf je 10 ccm Blut berechnet und drücken die Zunahme der Ameisensäure im gerinnenden Blute gegenüber dem frisch entnommenen Blute aus.

Spontane Gerinnung mg	Gerinnung 1 Stunde durch Eisküblung verhindert, dann spontan durch Erwärmen Gerinnung ausgelöst mg	Gerinnung durch gerinnungshemmende Mittel aufgehoben mg	Gerinnung im Oxalatblut durch Kalkzusatz mg
+ 0,1	+ 0,3	Oxalatblut + 0,0	+ 0,5
+ 0,1	+ 4,2	" + 0,0	+ 0,2
+ 0,3	+ 1,8	Hirudinblut + 0,0	
+ 1,0	+ 0,3	Citratblut + 0,0	
+ 0,9			

Die Zahlen der Tabelle XII lehren eine recht erhebliche *Zunahme der Ameisensäure während der Gerinnung gegenüber* dem Frischblut. Sie ergeben ferner sozusagen eine chemische Bestätigung der Gasanalysen, indem *ungerinnbar* gemachtes Blut, dessen oxydativer Zuckerabbau gestört ist, auch *keine Vermehrung der Ameisensäure* zeigt. Wird aber durch *Kalkzugabe* die Gerinnung in einem derartigen Blute wieder ermöglicht, so tritt in der kurzen Zeit während der Gerinnung *auch wieder eine Bildung von Ameisensäure auf.* Diese Zunahme der Ameisensäure im gerinnenden Blute deckt annähernd quantitativ das obenerwähnte Defizit.

Für die Frage nach den physiko-chemischen Veränderungen während des Gerinnungsprozesses schienen uns fortlaufende p_H-Bestimmungen von besonderem Interesse zu sein. Von *Kugelmass*[1]) wurde zuerst eine Abnahme der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration während der Gerinnung festgestellt.

Wir bedienten uns für unsere Untersuchungen des Potentiometers nach *Mislowitzer* und der Chinhydronelektrode. Die Methode hat den Vorzug, daß das Potential sich sehr rasch einstellt, dementsprechend konnten die Ablesungen in Pausen von 1 bis 2 Minuten erfolgen. Durch Verwendung der Goldspritzenelektrode, die eine Entnahme des Blutes aus dem Gefäß direkt gestattet, konnte auch ein Entweichen von Kohlensäure sicher vermieden werden. Soweit Plasma zur Untersuchung gelangte, wurde das Blut unter Paraffin aufgefangen und ebenso zentrifugiert, so daß auch hier ein Verlust von Kohlensäure ausgeschaltet wurde. Die Versuche wurden bei Körpertemperatur durchgeführt, indem die entsprechend vorgewärmten Elektrodengefäße während der Messung im Thermostaten bei 37° C standen

Unsere Ergebnisse, die in den Abb. 2 bis 4 wiedergegeben sind, bestätigen und erweitern die Angaben von *Kugelmass*. Die *H-Ionenkonzentration nimmt im gerinnenden Blute ab* (Abb. 2). *Im frischen Oxalatplasma* (3 Prom. Oxalat) zeigt sich jedoch ein *entgegengesetzter*

[1]) *Oppenheimer,* Die Fermente, 1925.

Verlauf der p_H-Kurve (Abb. 3). Hier tritt eine deutliche *Säuerung* auf. Setzt man jedoch zu demselben Plasma zur Auslösung der Gerinnung *Kalk* hinzu, so ändert sich das Bild. Es tritt fortlaufend eine *Abnahme der H-Ionenkonzentration ein* (Abb. 4), die Kurve ist also dann *dieselbe, wie beim spontan gerinnenden Blute.* Es muß darnach

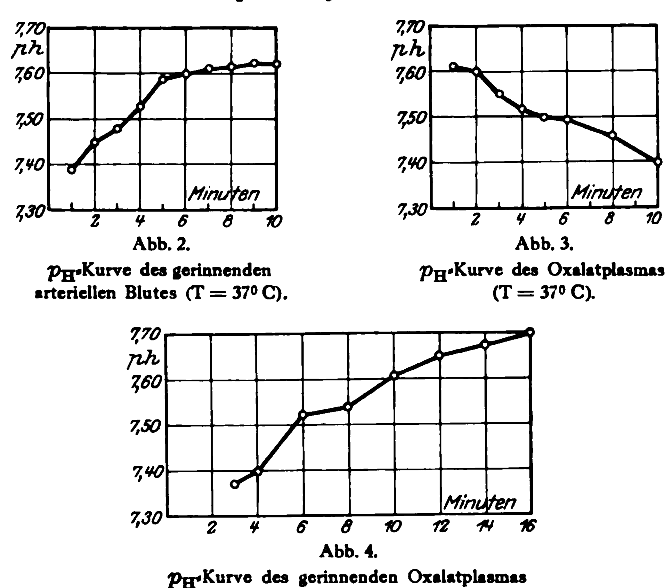


Abb. 2. p_H-Kurve des gerinnenden arteriellen Blutes (T = 37° C).

Abb. 3. p_H-Kurve des Oxalatplasmas (T = 37° C).

Abb. 4. p_H-Kurve des gerinnenden Oxalatplasmas nach Kalkzusatz (T = 37° C).

tatsächlich eine *Adsorption* von H-Ionen an die Plasmaeiweißkörper während des Gerinnungsprozesses stattfinden. Diese Adsorption führt zur Entladung und Gerinnung derselben. Bemerkenswert erscheint uns der umgekehrte Verlauf der p_H-Kurve im frischen Oxalatplasma und das Umbiegen zur Gerinnungskurve durch Kalkzugabe. Das Ausbleiben der Adsorption im erwähnten Falle scheint uns erneut für unsere Ansicht vom Angriffspunkt der gerinnungshemmenden Mittel an den Eiweißkörpern selbst zu sprechen. Auch hier sehen wir die Wirkung der Recalcifizierung, wie bei den analog verlaufenden Gasversuchen betont wurde, nicht allein in der Ausfällung der Oxalsäure, sondern ebenso in der physikalisch-chemischen Änderung der dispersen Phase durch den Kalkzusatz. Unsere Versuche haben den *Beweis für die besondere Bedeutung der oxydativen Phase des Zuckerabbaues für den Gerinnungsprozeß erbracht.* Eine Deutung dieses Prozesses für das Gerinnungsgeschehen ist jedoch schwierig. Wir dachten zuerst daran, daß die durch den oxydativen Prozeß frei werdende Energie für die Auslösung der Gerinnung unerläßlich sei. Dem steht aber entgegen, daß bis jetzt irgendwelche Wärmetönung bei der Gerinnung nicht

sicher nachgewiesen werden konnte. Ein diesbezüglich negatives Resultat erscheint uns allerdings nicht ganz beweisend. Ganz abgesehen von der mehr oder weniger großen Empfindlichkeit unserer Meßmethoden, könnten in einem so komplizierten Kolloidgemisch, wie Blut bzw. Plasma, gegensätzliche Prozesse ablaufen, die sich gegenseitig kompensieren. Andererseits besteht für den Eintritt der Gerinnung eine *optimale H-Ionenkonzentration*. Diesseits und jenseits derselben tritt keine Gerinnung ein. Ein Zuwenig Säure kann so einen ähnlichen Effekt haben, wie ein Zuviel, wobei in letzterem Falle auch sekundäre chemische Einwirkungen auf die Plasmaeiweißkörper eine Rolle spielen dürften. Es könnte so die oxydative Phase des Zuckerabbaues bzw. der Milchsäurezerstörung für die Erreichung des Optimums der H-Ionenkonzentration die besten Bedingungen liefern. (Das Produkt der Glykolyse, die Milchsäure, scheint diese Bedingungen allein nicht zu erfüllen.) Ob dabei auch eine sozusagen spezifische Wirkung bestimmter Säuren von Bedeutung ist, vermögen wir nicht zu sagen. Aber das *Postulat der oxydativen Phase* des Zuckerabbaues für den Gerinnungsprozeß glauben wir experimentell erwiesen zu haben.

Das Wesentliche unserer Untersuchungsergebnisse sehen wir in dem Nachweis der *Verknüpfung* von Blutzuckerabbau und Ablauf der Blutgerinnung. Die vitalen Prozesse der Glykolyse und Oxydation der Zuckerspaltprodukte gehen im absterbenden Blute weiter. Ja, sie werden zunächst sogar in verstärktem Maße einsetzen, da die mit dem Austritt des Blutes aus dem Gefäßsystem unvermeidlich verbundenen Läsionen der korpuskulären Elemente desselben die Glykolyse begünstigen werden. Wir erinnern in dieser Hinsicht an die bekannten Untersuchungen von *Fletcher* und *Hopkins* über die Bedeutung mechanischer Läsionen auf die postmortale Säurebildung im Muskel. Daß diese *Säurebildung sofort nach Entnahme des Blutes schon während des Gerinnungsprozesses* einsetzt, haben unsere vorstehenden Untersuchungen erwiesen. Wir finden so den allgemein gültigen Organprozeß der *postmortalen Säuerung* auch im absterbenden, gerinnenden Blute. Wie variabel aber dieser Prozeß in seiner vielseitigen Abhängigkeit von physikalischen und physikalisch-chemischen Faktoren verläuft, ist aus der Chemie des arbeitenden und totenstarren Muskels zur Genüge bekannt. Es ist unseres Erachtens deshalb auch gar nicht möglich, ein wirklich physiologisches Blut außerhalb des Gefäßsystems zu erhalten. Alle diesbezüglichen biologischen Untersuchungen beziehen sich auf Blut, indem die postmortale Säuerung mehr oder weniger physikalische Änderungen der Kolloide schon bedingt hat, also gerade die hauptsächlichsten Träger vitaler Prozesse sind abgeartet. Daß diese Vorgänge der postmortalen Blutglykolyse und oxydativen Zerstörung der Spaltprodukte die Plasmaeiweißkörper physikalisch-

chemisch beeinflussen *müssen*, ist selbstverständlich. Ihr Nachweis im Blute schon bei Entnahme aus dem Gefäßsystem *zwingt zu der Annahme ihrer ursächlichen Bedeutung für den Gerinnungsprozeß*. Dabei drängen sich Analogien zu den Vorgängen in der absterbenden Muskulatur auf, wie sie schon von *Kühne* und *Halliburton* vermutet wurden. Man kann unserer Meinung nach die *Blutgerinnung als die Totenstarre des Blutes* bezeichnen. Wobei wir jedoch betonen möchten, daß eine völlige Analogie im physikalisch-chemischen Geschehen deshalb nicht angenommen zu werden braucht, sogar durchaus unwahrscheinlich ist, im Hinblick auf die Verschiedenheit des morphologischen Substrats in beiden Fällen. Aber das scheint uns sicher zu sein, bei beiden Vorgängen ist die *Bildung der Milchsäure die Causa movens*. Welcher Art die dadurch bedingte kolloidchemische Änderung der Plasmaeiweißkörper ist, ob es sich um eine Entionisierung derselben und damit eintretende Gerinnung handelt, was unseres Erachtens am wahrscheinlichsten ist, vermögen wir heute noch nicht sicher zu entscheiden. So viel scheint uns aber auf Grund unserer Untersuchungen erwiesen, daß *beide Phasen des Zuckerabbaues*, die *anaerobe und aerobe*, für den normalen Ablauf des Gerinungsprozesses nötig sind. Der *Angriffspunkt der gerinnungshemmenden Mittel* liegt vor allem in *der Aufhebung der oxydativen Phase*. Kalkzusatz ermöglicht im Oxalatblut den Wiedereintritt der oxydativen Prozesse und damit die Gerinnung. Wir betrachten somit diesen *Blutzuckerabbau als auslösendes chemisches Moment des Blutgerinnungsprozesses*. Er führt im absterbenden, nicht mehr vital gepufferten System unabänderlich zur *Stabilisierung* des labilen Bluteiweißsystems und damit zur Gerinnung. Wir sprechen absichtlich nicht von Fibrinogen, da wir in letzterem kein chemisches Individuum erblicken, sondern die einzelnen Eiweißfraktionen nur als Ausdruck einer fortlaufenden Reihe von physikalischen Veränderungen betrachten. Damit, daß die Glykolyse ein fermentativer Prozeß ist, die Blutgerinnung als solchen zu betrachten, wäre falsch, so wenig man bisher bei dem biologisch ähnlichen Vorgang der Totenstarre daran dachte. Nur die *Produkte des fermentativen Prozesses* der *Zuckerzerstörung* geben die Bedingungen für die Blutgerinnung ab. Es gibt kein spezifisches Gerinnungsferment. Wir glauben durch unsere Untersuchungen nun auch die Möglichkeit gegeben zu haben, von einer *Chemie* der Blutgerinnung zu sprechen. Sie ist definiert durch ihre Verknüpfung mit den chemisch wohl charakterisierten Spaltungs- und Oxydationsprodukten der Zuckerzerstörung im Blute. Damit zerfällt die Blutgerinnung in *zwei biologisch scharf getrennte Abschnitte*, nämlich in die Bildungsphase jener Säuren des Zuckerabbaues, *ein rein chemischer Vorgang*, und in die Phase der *physikalisch-chemischen Zustandsänderungen der Plasmaeiweißkörper*, die ein Postulat der ersteren ist.

Über den Fermentstoffwechsel der Bakterien. III[1]).

Von

H. W. Nicolai.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 21. September 1926.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

I.

Nach der bereits von *Rona* und *Lasnitzki* (1) angegebenen und von *H. W. Nicolai* (2) bei Kiefernsamen angewandten Methode wurde eine Lipasebestimmung bei B. subtilis vorgenommen. Zu diesem Zwecke wurden Reinkulturen auf Schrägagar in der gleichen Weise verarbeitet, wie das in der ersten Mitteilung bezüglich der Gewinnung von Colisuspensionen angegeben wurde (3). Beim Filtrieren der Abschwemmungen konnten wir dabei regelmäßig beobachten, daß das Filtrat fast völlig klar durchlief und wegen des geringen Bakteriengehalts für die Untersuchung nur von geringem Wert war. Die Ursache hierfür ist wohl in dem positiven elektrischen Charakter der betreffenden Bakterienkolloide und der dadurch bedingten Adsorption an das Filtrierpapier zu suchen. Die Schwierigkeiten konnten umgangen werden, indem durch Glaswolle filtriert wurde; außerdem erwies es sich in diesen Fällen als vorteilhaft, die Suspensionen nicht durch Abschwemmen, sondern durch Abnehmen mit der Öse herzustellen.

[1]) Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und der Rockefellerstiftung ausgeführt.

Tabelle I (Abb. 1).
Subtilis mit Monobutyrin.

Gefäß-Nr.:	26		27		29	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5'	7,5	4,0	6,5	3,5	1,5	0,7
10	16,5	9,0	14,5	7,5	2,0	1,0
15	21,5	11,5	20,0	10,5	2,0	1,0
20	26,5	14,0	24,5	13,0	2,5	1,3
30	36,0	19,0	35,0	18,0	2,0	1,0
45	49,5	26,5	46,5	24,5	2,5	1,3
K_{CO_2}	532	—	521	—	507	—

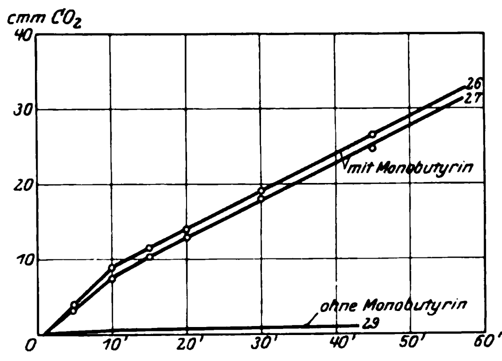


Abb. 1. Fettspaltung durch B. subtilis.

Das Ergebnis einer Lipasebestimmung ist aus Tabelle I und Abb. 1 zu ersehen. Bei der anaeroben Einwirkung auf Monobutyrin in den Gefäßen 26 und 27 ist eine gleichmäßige Druckzunahme zu beobachten, die im Sinne einer Aufspaltung des Fettes in Glycerin und Buttersäure und als sekundäre Austreibung von Kohlensäure aus dem Bicarbonat zu deuten ist. In der Kontrolle ohne Monobutyrin entstehen nur geringe, durch autolytische Prozesse bedingte Säuremengen, die praktisch vernachlässigt werden können. Die Tatsache, daß B. subtilis eine Lipase enthält, ist insofern interessant, als diese Bakteriengattung an der Unterseite von Gräsern anzutreffen ist und in den dort vorhandenen fettähnlichen Körpern des Epiderms einen besonders geeigneten Nährboden findet.

II.

Bei einer Reihe von Atmungsuntersuchungen war es uns aufgefallen, daß der Sauerstoffverbrauch unter sonst gleichen Bedingungen bemerkenswerten Schwankungen unterworfen war, wenn wir die O_2-Konzentration änderten. Um diesen Zusammenhang zwischen der Atmungsgröße, dem Quotienten Q_{O_2}, und der Sauerstoffkonzentration zu klären, wurden in mehreren Versuchsreihen mit verschiedenen Sauer-

stoffgemischen in den einzelnen Gefäßen bei Absorption der entstehenden Kohlensäure durch 30proz. KOH vergleichende Messungen vorgenommen, wobei in jedem Gefäß die gleiche Bakterienmenge in *R* (10) mit 3prom. Glycose suspendiert war. Die Tabellen und Abbildungen 2 und 3 enthalten zwei solcher Protokolle, bei denen mit künstlichen

Tabelle II. (Abb. 2).

Gefäß-Nr.: Gas:	21 99 Proz. O_2		23 4 Proz. O_2		25 21 Proz. O_2	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	24,0	12,0	0,5	0	9,0	4,5
10	51,0	26,0	6,0	3,0	28,0	13,5
15	72,5	37,0	12,0	6,0	44,0	21,0
20	92,0	47,0	17,0	8,5	59,0	28,5
30	130,0	67,0	27,0	13,5	92.5	44,5
45	—	—	39,5	19,5	145,0	69,5
K_{O_2}	512	—	492	—	480	—

Tabelle III. (Abb. 3).

Gefäß-Nr.: Gas:	20 21 Proz. O_2		21 21 Proz. O_2		24 10 Proz. O_2		25 99 Proz. O_2		26 99 Proz. O_2	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	29,5	13,0	13,5	7,0	3,5	2,0	28,5	15,0	35,0	15,0
10	55,0	24,5	31,5	16,0	9,5	5,0	58,5	31,0	71,0	31,0
15	77,0	34,5	49,0	25,0	17,0	9,0	90,5	47,5	110,5	48,0
20	94,5	42,0	65,5	33,0	24,0	13,0	122,5	64,0	149,0	65,0
31	141,0	63,0	107,0	54,5	42,5	22,5	191,0	100,0	—	—
40	178,5	79,5	138,5	70,0	56,0	29,5	—	—	—	—
K_{O_2}	447	—	507	—	530	—	523	—	438	—

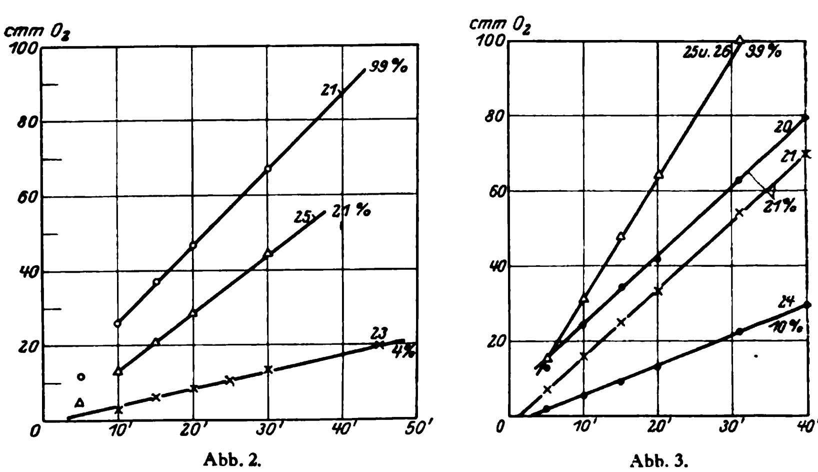


Abb. 2. Abb. 3.

Atmung bei verschiedener O_2-Konzentration.

Gemischen von 4 bzw. 10 Proz., sowie mit Luft (21 Proz.) und käuflichem reinen Sauerstoff (99 Proz.) gearbeitet wurde. Die Überlegenheit der höheren Konzentration ist bereits aus der verschiedenen Neigung der einzelnen Geraden evident, ebenso aber auch die Tatsache, daß keine lineare Proportion zwischen dem Sauerstoffpartialdruck und der Atmungsgröße besteht. Wir haben die Quotienten Q_{O_2} für die einzelnen Gefäße in der Art verglichen, daß wir die in der gleichen Zeit verbrauchten Sauerstoffmengen ausrechneten und die Atmung in 99proz. Sauerstoff = 1,0 setzten. Trägt man dann in einem Koordinatensystem die Q_{O_2} in linearem Maße als Ordinaten und die Logarithmen der Sauerstoffkonzentration als Abszissen ein, so ergibt sich in höchster Annäherung ein geradliniger Zusammenhang. (Abb. 4).

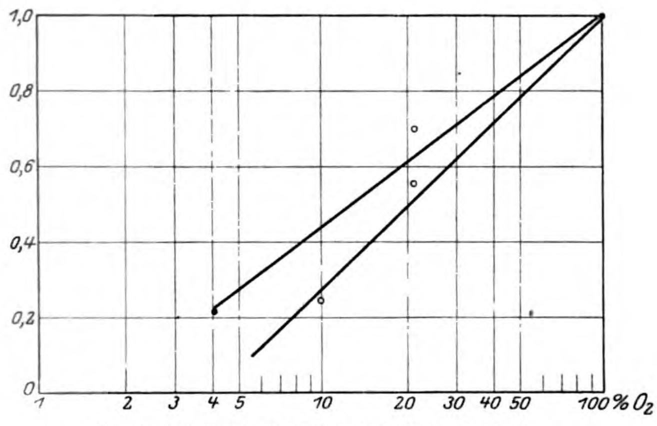


Abb. 4. Atmungsgeschwindigkeit in O_2-N_2-Gemischen.

Man kann die hier gefundene Gesetzmäßigkeit wohl allgemein für die Atmung einer Zelle überhaupt aussprechen, und es ergibt sich damit einmal die bemerkenswerte Tatsache, daß ein Atmungsquotient, der bei einer Untersuchung in reinem Sauerstoff ermittelt wurde, nicht mit der Atmung in atmosphärischer Luft oder gar bei geringeren O_2-Konzentrationen verglichen werden kann, daß besonders bei niedrigem Sauerstoffgehalt schon geringe Schwankungen in der Zusammensetzung des Gasgemisches relativ große Änderungen der Atmungsgröße zur Folge haben. Wenn man ferner den Umstand berücksichtigt, daß der Sauerstoff an den chemischen Prozessen teilnimmt, die das Wesen der Atmung ausmachen, also gewissermaßen ein „Substrat" für die Atmungsfermente ist, so hat es einen gewissen Wert, in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß im Gegensatz zu den übrigen Faktoren (Konzentration der Zellen und des Zuckers) die funktionelle Beziehung des Sauerstoffs zur Atmung keine einfach lineare ist.

Daß die chemischen Leistungen der Colibakterien weitgehend von der h unabhängig sind, wurde bereits früher angedeutet (4). Wir haben in einer Reihe von Versuchen mit einer anderen als der zuerst beschriebenen Methode vergleichende Messungen in Phosphatpuffern zwischen p_H = 4,63 und 7,37 angestellt, die in einem Protokoll in Abb. 5 und Tabelle IV a und b wiedergegeben sind. Die p_H-Messung wurde mit der Becherelektrode nach *Ernst Mislowitzer* (5) vorgenommen, deren Außenpotential wir der Einfachheit halber nicht mehr gegen eine gesättigte Kalomelelektrode, sondern gegen eine Veibelelektrode messen. Die nach *Sörensen* hergestellten Phosphatlösungen waren bereits mehrere Monate alt und ergaben deshalb nicht

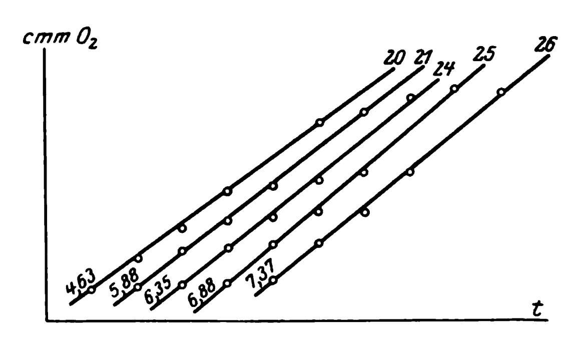


Abb. 5. Atmung bei verschiedenem p_H.

Tabelle IV a (Abb. 5).

Gefäß-Nr.: p_H:	20 4,63		21 5,88		24 6,35		25 6,88		26 7,37	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	16,0	7,0	15,0	7,5	15,5	8,0	16,0	8,5	20,5	9,0
10	32,0	14,0	30,5	15,5	30,5	16,0	32,5	17,0	39,5	17,0
15	46,0	20,5	44,0	22,5	44,0	23,0	46,0	24,0	56,0	24,0
20	64,0	28,5	59,0	30,0	58,5	31,0	62,0	32,5	75,5	32,5
30	96,5	43,5	90,5	46,0	92,0	49,0	96,5	51,0	117,5	50,0
K_{O_2}	447		507		530		523		438	

Tabelle IV b.

t = 25° C, ϑ = 59,1. Außenflüssigkeit gemessen gegen Veibelelektrode ergibt E = 156 MV = 2,64 p_H-Einheiten. Die Bezugselektrode hat also den Wert 2,04 + 2,64 = 4,68.

Prim. Phosphat	10,0	8,8	7,0	4,0	1,7
Sek. Phosphat	—	1,2	3,0	6,0	8,3
Gemessen in MV . . .	—3	71	99	130	159
E/ϑ	—0,05	1,20	1,67	2,20	2,69
$p_H = 4{,}68 + E/\vartheta$ . . .	4,63	5,88	6,35	6,88	7,37

genau den theoretisch erwarteten Wert. Die graphische Darstellung wurde aus Gründen der Deutlichkeit in der Art vorgenommen, daß die einzelnen Kurven auf einen Abstand von je 5 Minuten auseinandergezogen wurden, um eine Überdeckung zu verhindern. Ein ausgesprochenes Optimum ist innerhalb der untersuchten Grenzen nicht festzustellen, ein Befund, der mit den früheren Ergebnissen übereinstimmt, nach denen die Atmung erst bei $p_H = 4{,}03$ sistiert. Dieser ausgesprochenen Unempfindlichkeit der Atmung gegen Änderungen physikalisch-chemischer Natur werden wir in dieser Mitteilung noch einmal begegnen.

Eine Reihe weiterer Versuche hatte zum Ziele, den Einfluß verschiedener Zuckerkonzentrationen festzustellen. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs in verschiedenen Gefäßen mit gleicher Bakterienmenge wurde im allgemeinen bei einer O_2-Konzentration von 21 Proz. ausgeführt, in einigen Fällen bei 4 bzw. bei 99 Proz. (Tabelle Va bis d). Ganz allgemein läßt sich dabei zunächst feststellen, daß bei höheren Glykosekonzentrationen die Atmungsgröße sinkt, wenn man als Maß wieder die in der gleichen Zeit von der gleichen Bakterienmenge verbrauchten Sauerstoffmengen heranzieht. Trägt man diese Quotienten Kubikmillimeter O_2/t in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration

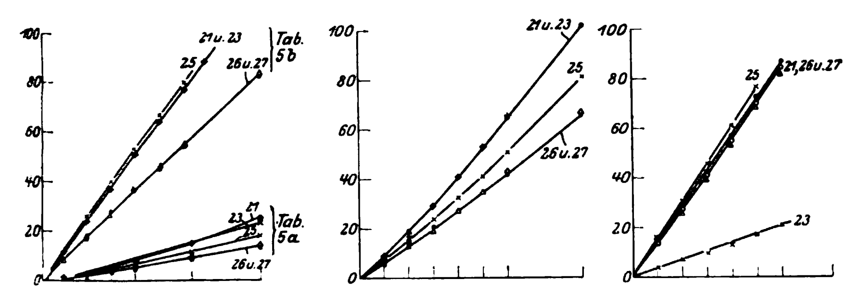


Abb. 6. Atmung bei verschiedenen Glykosekonzentrationen.

Tabelle Va. (Abb. 6).

Gefäß-Nr.: Glykose:	21 1 Prom.		23 5 Prom.		25 25 Prom.		26 125 Prom.		27 180 Prom.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	3,0	1,5	3,5	1,5	1,5	0,5	3,0	1,5	3,0	1,5
10	6,0	3,0	7,0	3,5	5,0	2,5	4,5	2,0	6,0	2,5
15	11,0	5,5	12,5	6,0	9,5	4,5	8,0	3,5	9,5	4,0
20	16,5	8,0	18,5	9,0	14,0	6,5	11,5	5,0	13,5	6,0
31	27,0	15,0	31,0	15,0	24,0	11,5	20,0	9,0	22,5	10,0
45	50,0	25,5	48,5	23,5	37,5	18,0	31,5	14,0	34,5	15,0
K_{O_2}	512	—	492	—	480	—	451	—	440	—

in 5 Proz. O_2.

Tabelle Vb.

Gefäß-Nr.:	21		23		25		26		27	
Glykose:	1 Prom.		5 Prom.		25 Prom.		125 Prom.		180 Prom.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	22,5	11,5	24,0	12,0	25,5	12,0	18,5	8,5	18,5	8,0
10	47,5	24,5	49,0	24,0	54,0	26,0	39,5	17,5	40,5	18,0
15	72,5	37,0	75,5	37,0	83,0	40,0	62,0	28,0	63,0	27,5
20	99,0	51,0	103,0	50,5	111,0	53,0	81,0	36,5	84,0	37,0
25	125,5	64,0	130,5	64,0	139,0	67,0	101,0	45,5	105,0	46,0
30	150,5	77,0	157,0	77,0	166,0	80,0	119,5	54,5	125,0	55,0
34	173,0	88,0	178,0	87,5	—	—	—	—	—	—
38	—	—	—	—	208,5	100,0	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	—	183,0	82,5	188,5	83,0
K_{O_2}	512		492		480		451		440	

in 21 Proz. O_2.

Tabelle Vc.

Gefäß-Nr.:	21		23		25		26		27	
Glykose:	3 Prom.		100 Prom.		126 Prom.		159 Prom.		200 Prom.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	18,0	9,0	18,0	9,0	16,0	7,5	14,5	6,5	14,0	6,0
10	37,0	19,0	37,5	18,5	33,0	16,0	29,5	14,5	30,0	13,0
15	37,0	29,0	58,5	29,0	49,5	24,0	45,0	20,5	45,5	20,0
20	80,0	41,0	83,0	41,0	68,0	32,5	60,5	27,0	62,0	27,0
25	104,0	53,0	108,0	53,0	86,0	41,0	76,5	34,5	79,0	34,5
30	127,5	65,0	184,0	66,0	106,5	51,0	93,5	42,0	96,5	42,5
45	200,5	102,0	—	—	168,0	81,0	147,5	66,5	152,0	67,0
K_{O_2}	512		492		480		451		440	

in 21 Proz. O_2.

Tabelle Vd.

Gefäß-Nr.:	21		23		25		26		27	
Glykose:	3 Prom.		3 Prom.		3 Prom.		200 Prom.		200 Prom.	
O_2:	21 Proz.		5 Proz.		99 Proz.		99 Proz.		99 Proz.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	26,0	13,5	7,0	3,5	32,0	15,5	31,0	14,0	29,5	13,0
10	54,0	27,5	14,5	7,0	63,5	30,5	61,5	28,0	59,5	26,0
15	80,0	41,0	19,5	9,5	95,0	45,5	92,0	41,5	90,0	39,5
20	107,0	55,0	26,5	13,0	127,0	61,0	125,0	56,5	122,0	54,0
25	136,0	70,0	34,5	17,0	158,0	76,0	160,5	72,5	155,5	68,5
30	163,5	84,5	42,5	21,0	—	—	193,0	87,0	186,5	82,0
K_{O_2}	512		492		480		451		440	

wieder als Koordinaten ein (Abb. 7), so ist außerdem noch ein deutliches Optimum, sowie ein verschiedenes Verhalten beim Wechsel der Sauerstoffkonzentration zu erkennen. Die Deutung dieser Zusammenhänge ist in mehrfacher Beziehung kompliziert, wenn man berücksichtigt, daß nicht allein die Wechselwirkungen zwischen einem Ferment und Substrat bei den vorliegenden Untersuchungen in Erscheinung treten, sondern darüber hinaus infolge der Änderungen des osmotischen Druckes auch Schädigungen der lebenden Zellen, deren chemische Leistungen mutmaßlich von dem Zustand dieser Zellen abhängig sind.

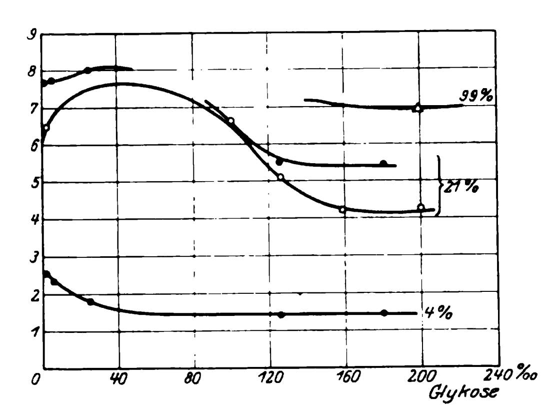


Abb. 7.
Atmungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Glykosekonzentrationen.

Tabelle VI. (Abb. 11.)

Anaerob.

Glykose, Prom. . . .	1	3	9	27	80	81	120	180	270
Umsatz	4,5	4,7	5,05	5,45	4,95	5,05	4,55	3,2	1,5

Glykose, Prom. . . .	3	100	126	159	209
Umsatz	3,3	3,7	3,1	2,35	1,55

Aerob 21 Proz. O_2. (Abb. 7.)

Glykose, Prom. . . .	1	5	25	125	180	3	100	126	150	200
Umsatz	7,7	7,7	8,0	5,45	5,50	6,5	6,6	8,1	4,2	4,25

	4 Proz. O_2.					99 Proz. O_2.	
Glykose, Prom. . . .	1	5	25	125	180	3	200
Umsatz	2,55	2,35	1,80	1,40	1,45	7,60	7,00

Diese Annahme würde einmal die Ausbildung eines Optimums an den Kurven der Tabelle VI mit einem an dieser Stelle bestehenden optimalen osmotischen Druck erklären. Daß bei weitgehender Anreicherung des Zuckers der Atmungsquotient nicht unter einen bestimmten Wert absinkt, der seinerseits wieder von der Sauerstoffkonzentration abhängt (s. auch Abschnitt II, Abs. 1 dieser Mitteilung), spricht dafür, daß die Atmung unabhängig von der Zellschädigung noch

weitergeht. Bei den niedrigen O_2-Konzentrationen (Tabelle Va) kommt es, wie mehrere Versuchsreihen übereinstimmend zeigen, nur zu einem angedeuteten Optimum.

Inwieweit die Wirkung des osmotischen Druckes bei der Untersuchung der anaeroben Glykolyse zu beobachten ist, wird später gezeigt werden (Abschnitt 4 dieser Mitteilung). Wir haben zunächst die Einflüsse des osmotischen Druckes weiterhin unter aeroben Verhältnissen verfolgt und gleichzeitig die Frage der Ionenwirkungen untersucht. Diese Versuche wurden in der Art ausgeführt, daß die Bakterien in einer dem Säugetierserum isotonen Lösung von $NaCl$, KCl bzw. $CaCl_2$, $MgCl_2$ suspendiert wurden. Unter der praktisch in diesem Falle zulässigen Annahme einer fast völligen Dissoziation verwandten wir hierzu 0,153 bzw. 0,102 mol. (blutisotone) Konzentrationen. Zugleich wurde eine Reihe von Lösungen des betreffenden Salzes in geometrisch steigender Konzentration angesetzt, deren osmotische Drucke, bezogen auf Blut = 1, die Werte 1, 2, 4, 8 und 16 hatten, und jede Lösung mit $^1/_{10}$ Volumen einer 5proz. Glykoselösung versetzt. Für den Versuch wurden 0,5 ccm der Bakterienemulsion mit 0,7 ccm der zuckerhaltigen Salzlösung in das Gefäß einpipettiert und die Retorte mit 0,3 ccm KOH beschickt. Durch die Mischung der verschieden konzentrierten Lösungen sanken die Drucke auf 0,95, 1,48, 2,53, 4,65 bzw. 8,87 (Blut = 1). Die bei Untersuchungen mit anderen Verdünnungen erzielten Drucke sind aus Tabelle VII zu ersehen, in der die Atmungsquotienten

Tabelle VII. (Abb. 8).
Werte von Q_{O_2} nach 45 Minuten.

	Osmotischer Druck *):											
	0,95		1,42		1,48		2,22		2,53		3,80	
KCl	79,0	113,0	—	—	97,5	139,5	—	—	75,0	107,0	—	—
NaCl	85,0	112,0	—	—	100,0	132,0	—	—	78,0	103,0	—	—
$CaCl_2$	—	—	35,5	91,0	—	—	29,5	76,0	—	—	19,0	48,5
	—	—	52,5	81,0	—	—	51,5	79,0	—	—	34,5	53,0
	63,0	82,0	—	—	91,5	119,0	—	—	65,0	84,5	—	—
$MgCl_2$	—	—	78,0	106,0	—	—	76,5	103,5	—	—	54,5	74,0
	85,0	106,0	—	—	76,0	95,0	—	—	5,10	64,0	—	—

	Osmotischer Druck								Ringer	
	4,65		6,96		8,87		13,28			
KCl	67,0	96,0	—	—	9,5	13,6	—	—	70,0	100
NaCl	69,0	91,0	—	—	7,0	9,2	—	—	76,0	100
$CaCl_2$	—	—	2,5	6,4	—	—	0	—	39,0	100
	—	—	6,0	9,25	—	—	—	—	65,0	100
	37,5	48,5	—	—	25,0	32,5	—	—	77,0	100
$MgCl_2$	—	—	22,0	30,0	—	—	3,0	4,0	74,0	100
	22,5	28,0	—	—	0	—	—	—	80,0	100

*) Der osmotische Druck ist bezogen auf den des Blutserums = 1.

eingetragen sind, die in diesem Falle den nach 45 Minuten in jedem Gefäß verbrauchten Sauerstoff in Kubikmillimetern angeben. Die Tabelle enthält außerdem noch vergleichsweise die Atmungsgröße in einer Ringerlösung. Setzten wir diese für jede wagerechte Reihe = 100 und rechnen die übrigen Werte in den zweiten Spalten entsprechend um, so erhalten wir die Werte für Q_{O_2} sämtlich in kommensurabler Form, sie geben, graphisch in Abb. 8 dargestellt, ein einwandfreies Bild von der Bedeutung des osmotischen Drucks für die Atmung und gleichzeitig auch von der Wirkung der Ionen.

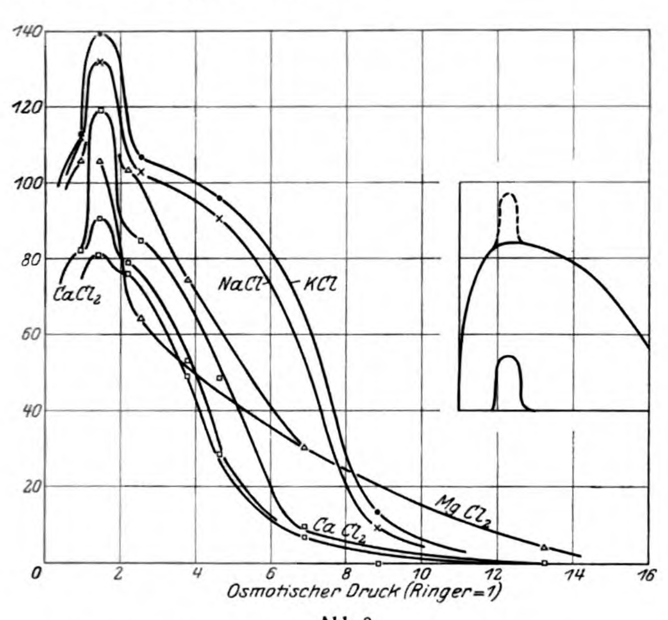


Abb. 8.
Atmungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

In allen Fällen ist der Abszissenpunkt 1,5 durch ein steiles Optimum des Sauerstoffverbrauchs ausgezeichnet; zwischen den einzelnen Ionen besteht dabei nur ein geringer Unterschied, insofern die Alkalichloride auf die Zelle günstiger zu wirken scheinen als die Erdalkalien. Es kann indessen keinem Zweifel unterliegen, daß dieses Optimum eine Stelle der Unstetigkeit im gesamten Kurvenverlauf darstellt, daß hier gewissermaßen eine Überlagerung zweier kurvenmäßiger Darstellungen eingetreten ist, die in getrennter Form nach Art der Abb. 8a denkbar wären: die atmungsregulierenden Faktoren sind offenbar komplexer Natur, neben einer gegen osmotische Änderungen relativ unempfindlichen Komponente existiert noch eine zweite von höchster Empfindlichkeit, die nur in einem engen Druckbereich in Erscheinung

tritt. Die bereits oben angeschnittenen Fragen, inwieweit für eine optimale Leistung neben anderen Faktoren die Integrität der Zelle von Bedeutung ist, tauchen auch bei dieser Gelegenheit wieder auf, und man kann die Vermutung nicht von der Hand weisen, daß in dem Komplex der Atmungsfermente sich ein gegen Quellung äußerst empfindlicher Anteil befindet, dessen Existenz auch durch die vorher mitgeteilten Befunde wahrscheinlich gemacht wird.

Die analogen Ergebnisse bei den anaeroben Spaltungen bleiben einer späteren Mitteilung vorbehalten.

Die bereits gelegentlich der Arbeit mit B. subtilis beobachtete schlechte Filtrierbarkeit der Suspensionen trat auch bei den Coliabschwemmungen auf, die ohne Bicarbonat vorgenommen wurden, besonders bei der Anwesenheit der zweiwertigen Kationen, deren umladende Wirkung bereits eine recht beträchtliche ist. In Anlehnung an die von *L. Michaelis* mitgeteilte Untersuchung über den isoelektrischen Punkt von Bakterien (6) beobachteten wir das Verhalten von Coli in einer Reihe vom Acetatpuffern von $p_H = 3,5$ bis 5,0, die ein ausgesprochenes Flockungsoptimum enthalten, dessen Lage und Intensität aus Abb. 9 hervorgeht. Mit $AlCl_3$ in steigender Konzentration wird der isoelektrische Punkt nach der sauren Seite verschoben und insofern undeutlicher, als nach kurzer Zeit alle Röhrchen zu flocken beginnen. Daß bei der physiologischen Acidität der elektrische Charakter der Colibakterien negativ ist, konnte an der Wanderung im elektrischen Felde nach der Anode bestätigt werden.

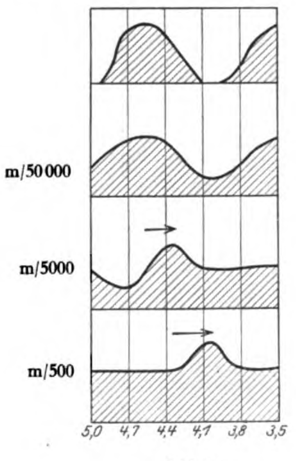


Abb. 9.
Flockung der Colibakterien.

Wenn auch die Kolloide des Bakterienleibes bereits bei 4,7 beginnen, unstabil zu werden, so geht doch die Atmung noch längere Zeit in Gegenwart von Zucker ungestört weiter. Der hierin scheinbar liegende Widerspruch löst sich zum Teil, wenn man berücksichtigt, daß die Flockungsreihe an Zellen vorgenommen wird, die durch Abwaschen mit reinem Wasser bereits recht geschädigt sind (Cytolyse ?), während die zur Untersuchung der Atmung bei saurem p_H benutzten Bakterien wenigstens vorher nicht den Insulten einer osmotischen Schädigung ausgesetzt waren. Gelegentliche Versuche haben übrigens ergeben, daß auch die Reste cytolysierter Zellen den Zucker noch veratmen und anaerob spalten können, so daß die Wirkung der Fermente nicht ausschließlich an die Existenz der lebenden Zelle gebunden zu sein scheint.

Bezüglich der besonders beim Studium der Bakterienkatalase beobachteten Fermentwirkungen zerstörter Zellen verweisen wir auf die folgende Mitteilung (7).

III.

Die gelegentlich der aeroben Versuche beobachteten Änderungen des Atmungsquotienten bei verschiedenen osmotischen Drucken kehren auch bei der Untersuchung der anaeroben Glykolyse wieder, wenn die Zuckerkonzentration eine gewisse Höhe übersteigt. Die Versuchsanordnung war in diesen Fällen die gleiche, wie die im Abschnitt 2c beschriebene, die Konzentrationen wechselten in einem Bereich zwischen 1 und 270 Prom. Glykose, Tabelle VIII a bis c und Abb. 10 gibt eine Reihe

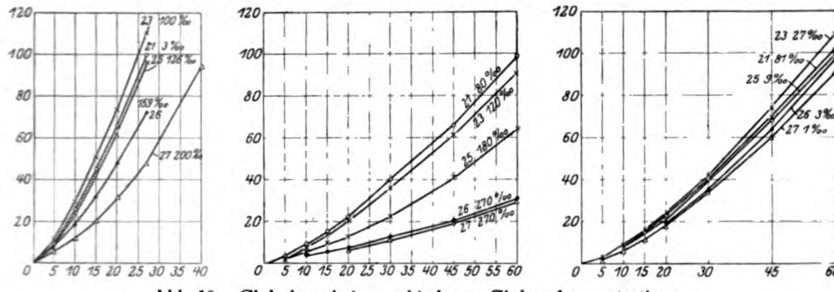


Abb. 10. Glykolyse bei verschiedenen Glykosekonzentrationen.

Tabelle VIII a. (Abb. 10).

Gefäß-Nr.: Glykose:	21 3 Prom.		23 100 Prom.		25 126 Prom.		26 159 Prom.		27 200 Prom.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	16,0	9,5	20,0	11,4	15,0	8,5	14,5	8,0	10,5	5,5
10	43,5	25,9	51,5	29,5	41,5	23,0	34,5	18,5	22,5	12,0
15	75,5	44,9	88,5	51,0	74,0	41,0	60,5	32,0	39,5	20,5
20	111,0	66,0	128,0	73,5	111,5	62,0	89,5	48,0	60,0	31,5
27	168,0	100,0	192,0	110,0	167,5	96,0	135,0	72,0	91,5	48,0
40	—	—	—	—	—	—	—	—	179,5	94,0
K_{CO_2}	593		573		557		532		521	

Tabelle VIII b.

Gefäß-Nr.: Glykose:	21 80 Prom.		23 120 Prom.		25 180 Prom.		26 270 Prom.		27 270 Prom.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	5,0	3,0	5,5	3,0	4,5	2,5	4,5	2,5	4,0	2,0
10	15,0	9,0	14,5	8,0	10,0	5,5	8,0	4,5	7,5	4,0
15	26,0	15,5	25,0	14,5	16,5	9,0	11,5	6,0	10,5	5,5
20	38,0	22,5	35,5	20,5	23,0	13,0	14,5	7,5	13,5	7,0
30	66,0	34,0	63,0	36,0	40,5	22,5	23,5	12,5	22,0	11,5
45	111,5	66,0	107,0	61,5	73,5	41,0	38,5	20,5	37,5	19,5
60	166,5	99,0	159,0	91,0	115,0	64,0	58,0	31,0	57,0	30,0
K_{CO_2}	593		573		557		532		521	

Tabelle VIII c.

Gefäß-Nr.: Glykose:	21 81 Prom.		23 27 Prom.		25 9 Prom.		26 3 Prom.		27 1 Prom.	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	3,5	2,0	5,0	3,0	4,0	2,0	0,5	0	2,0	1,0
10	14,0	8,5	16,5	9,5	14,5	8,0	11,5	6,0	11,5	6,0
15	24,5	14,5	28,5	16,5	25,5	14,0	22,0	11,5	22,0	11,5
20	38,0	22,5	42,5	24,5	39,0	21,0	36,0	19,0	35,0	18,5
30	67,5	40,0	73,5	42,0	70,0	39,0	66,5	35,5	64,0	33,5
45	114,5	68,0	128,0	74,0	124,0	69,0	120,0	64,0	114,5	60,0
60	170,5	101,5	190,0	109	188,0	100,0	183,0	97,5	174,0	91,0
K_{CO_2}	593		573		557		532		521	

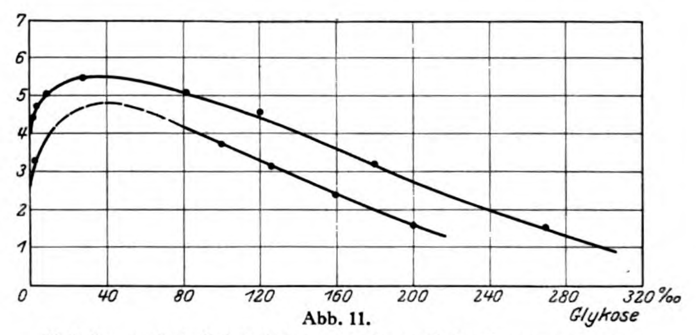


Abb. 11.
Glykolysegeschwindigkeit bei verschiedenen Glykosekonzentrationen.

der bei diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse wieder. Das Optimum des Druckes ist aus Abb. 11 ersichtlich, in der die Q_{CO_2} in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration eingetragen sind. Ebenso wie bei der Atmung ist auch hier eine Konzentration von 35 bis 40 Prom. durch ein Maximum ausgezeichnet, entsprechend im Mittel einer 0,21 mol. Lösung oder einem osmotischen Druck von 0,65 (Blut = 1,0), der durch die Salze der Ringerlösung auf 1,65 erhöht wird. Unabhängig von der Natur dieser Salze im einzelnen konnten wir bereits vorher zeigen, daß dieser optimale Druck für die *Atmung* in jedem Falle festzustellen ist; er ist nach dem eben Gezeigten auch von Bedeutung für ein zweites Ferment.

Beim Vergleich der in Abb. 7 u. 11 eingetragenen Kurvenscharen fällt weiterhin der Unterschied zwischen der Atmung und der Glykolyse bei höheren Konzentrationen auf, die auf osmotische Änderungen in verschiedener Weise reagieren, indem die eine nicht unter einen bestimmten Wert absinkt, während die andere proportional mit der zunehmenden Salzkonzentration nachläßt. Inwiefern hierbei die einzelnen Ionen eine Rolle spielen und ob es sich um eine Erscheinung an einem gegen Veränderungen des osmotischen Druckes besonders empfindlichen glyko-

lytischen Ferments im Gegensatz zu dem mehr unempfindlichen Komplex der Atmung handelt, werden weitere Untersuchungen zeigen.

IV.

Eine im wesentlichen noch völlig ungeklärte Frage ist die nach dem Wesen des Zuckerabbaues. Daß unter anaeroben Bedingungen nur Glykose und Lävulose regelmäßig in zwei Säuremoleküle gespalten wird, haben wir bereits mitgeteilt und bei unseren Untersuchungen stets wiedergefunden. Galaktose wird ebenso wie Lactose, Saccharose und Maltose nicht angegriffen. Die geringen, anfänglich frei werdenden Säuremengen (Tabelle IXa und Abb. 12a) bei den letztgenannten Zuckern sind Verunreinigungen, die z. B. bei reinster Saccharose für kalorimetrische Zwecke auf ein Minimum reduziert werden können. Auch von einer großen Reihe weiterer Substrate, die zum Zuckerabbau in hypothetischen Beziehungen stehen, war bezüglich einer Aufspaltung unter anoxybiontischen Bedingungen nichts festzustellen.

Tabelle IXa. (Abb. 12).

Gefäß-Nr.: Substrat:	20 —		21 Glykose		23 Galaktose		24 Maltose		25 Saccharose		26 Lactose	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	— 1,5	—	2,5	1,5	5,0	3,0	3,0	2,0	1,0	0,5	— 1,0	—
10	+ 1,0	—	12,5	7,5	15,0	8,5	11,0	6,5	2,5	1,0	+ 1,5	1,0
15	1,5	—	23,0	13,5	25,5	14,5	13,0	8,0	4,0	2,0	3,0	1,5
20	2,0	—	33,0	19,5	35,5	20,5	14,5	8,5	4,5	2,5	2,5	1,0
25	1,5	—	43,0	25,0	39,0	22,5	14,0	8,5	4,0	2,0	2,5	1,0
30	1,0	—	55,0	32,0	40,5	23,5	14,0	8,5	4,0	2,0	3,0	1,5
45	0,0	—	91,0	53,0	43,0	24,5	13,5	8,0	3,0	1,5	3,0	1,5
K_{CO_2}	528		587		574		610		603		516	

Tabelle IXb.

Gefäß-Nr.: Substrat:	20 *) Brenztraubens.		21 — R (10)		23 Glykose		24 Valerians.		25 Acetoin		26 Dioxyaceton	
	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm	mm	cmm
5′	45,0	23,5	1,0	—	4,5	2,5	61,0	37,0	0,0	—	1,0	0,5
10	47,0	25,0	1,0	—	15,0	8,5	66,0	40,5	0,0	—	3,0	1,5
15	47,0	—	1,0	—	28,0	16,0	67,0	41,0	0,5	—	7,0	3,5
20	47,0	—	1,0	—	43,0	24,5	67,0	—	1,0	—	11,5	6,0
30	47,5	—	0,0	—	73,0	42,0	66,5	—	0,5	—	16,0	8,5
45	47,0	—	0,0	—	130,0	75,0	66,0	—	1,0	—	22,0	11,5
55	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24,0	12,0
61	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25,5	13,0
K_{CO_2}	528		587		574		610		603		516	

*) Im Gefäß 20 befand sich R (0).

In Tabelle IXb und Abb. 12b sind einige dieser Versuche mitgeteilt, bei denen die Gasentwicklung auf eine Neutralisation im Beginn des Versuchs unmittelbar nach der Mischung zurückgeführt werden muß; nur bei Dioxyaceton scheint eine längere kontinuierliche Säurespaltung zu bestehen, die aber mit einer Verunreinigung durch Methylglyoxal zusammenhängen kann, und deren Diskussion aufgeschoben werden muß, bis uns ein reines Präparat zur Verfügung steht.

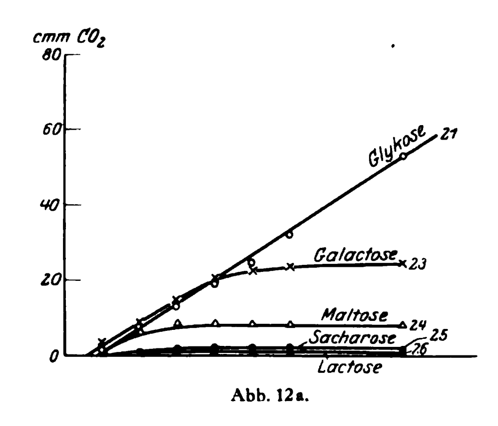


Abb. 12a.

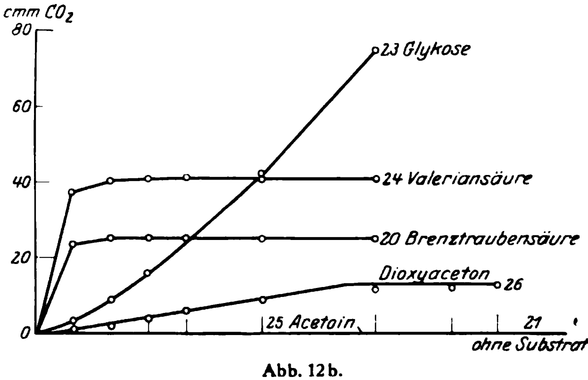


Abb. 12b.

Anaerobe Versuche mit verschiedenen Substraten.

Wesentlich mehr Ergebnisse brachten die Untersuchungen über die Atmung bei Anwesenheit der verschiedenen Atmungssubstrate, die eine weitgehende Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen zur Folge hatten. Aus einer großen Zahl der hierher gehörenden Versuche sind in Tabelle X die ermittelten Werte von Q_{O_2}, bezogen auf den Sauerstoffverbrauch in einer R (10) mit 3 Prom. Glykose = 100 mitgeteilt. Da bei den einzelnen Versuchen die Bakterienzahl nie gleich war, haben wir in einigen Fällen in Klammern die Atmung der Zellen

Tabelle X.

Atmungsquotienten bei verschiedenem Substrat im Vergleich zur Glykose (= 100).

Alanyl-Glycin	66			
Alanin	80			
Glykokoll	25			
Tryptophan *)	20,5			
Tyrosin *)	37,5			
Leucin *)	46			
Alanin + Glykose	130			
Glykokoll + Glykose	130			
Methylalkohol	18	16	20 (20)	32 (32)
Äthylalkohol	25	25		
Propylalkohol	26	24	23 (21)	
Amylalkohol	17	14		
Isobutylalkohol	35 (32)	34 (30)		
Äthylenglykol	16 (16)			
Acetoin	20,5 (20,5)	26,5 (23,5)		
Propionsäure	65	63	46 (21)	35,5 (9,5)
Milchsäure	90	88 (21)		
Buttersäure	68	66,5		
Bernsteinsäure	78	73		
Brenztraubensäure	100	100		
Valeriansäure	36 (30,5)			
Glycerinphosphorsäure	76 (16)	97 (30,5)		
Ölsäure	37 (16)			
Formaldehyd	19	21 (32)		
Acetaldehyd	25 (32)	11 (15)		
Dioxyaceton	71	66 (25)	63 (20,5)	62,5 (9,6)
Lävulose	104	106		
Galaktose	37 (23,5)			
Maltose	27,5 (16)			
Saccharose	16 (16)			
Lactose	63 (16)			

*) Diese Substanzen waren in gesättigter Lösung, die übrigen $^{1}/_{60}$ molar.

ohne Substrat ebenfalls angegeben. Es ist dabei ersichtlich, daß die Atmungsgröße, gemessen an Glykose, unabhängig von der Zellkonzentration bei vielen Substraten stets gleich bleibt (z. B. Dioxyaceton), daß bei anderen dagegen große relative Schwankungen zu beobachten sind (z. B. Methylalkohol, Propionsäure, Glycerinphosphorsäure, Acetaldehyd), die mit der Zahl der anwesenden Zellen parallel gehen. Es handelt sich hier offenbar um zwei verschiedene Gruppen von Stoffen, von denen die erste den Energiebedarf der Bakterien ausreichend zu decken imstande ist, während bei Anwesenheit der zweiten die Leibessubstanz der Zellen mehr oder weniger in die Oxydationsvorgänge mit hineinbezogen wird, eine Vermutung, die durch die Erfahrungen mit diesen Substraten bei anderen Gelegenheiten nur gestützt wird.

Diese Vorversuche zur Klärung des Zuckerabbaues werden weitergeführt, es sei am Schluß dieser Mitteilung nur noch auf die auffallende Tatsache hingewiesen, daß die Oxydation der Glykose bedeutend schneller vor sich geht, wenn gleichzeitig eine Aminosäure anwesend ist (Alanin + Glycose bzw. Glykokoll + Glykose). Parallelversuche haben gezeigt, daß es sich hier nicht um die Summe zweier Vorgänge handelt, vielmehr findet man bei gleichzeitiger Veratmung von beispielsweise Glykose und Dioxyaceton nur 100, also keine Erhöhung. Ob es sich hierbei um die Bildung einer *Schiff*schen Base handelt, die bekanntlich auf der alkalischen Seite von $p_H = 6{,}6$ sich spontan bildet, müssen weitere Untersuchungen lehren.

Herrn Professor Dr. *Rona* spreche ich an dieser Stelle für die Förderung der Arbeit meinen ganz besonderen Dank aus.

Zusammenfassung der zweiten und dritten Mitteilung.

1. Es wird eine Methode und ein Gefäß beschrieben, um auch die aeroben Versuche vom Beginn ab verfolgen zu können.

2. Bei der Prüfung auf weitere Fermente kann in einem Falle eine Maltase festgestellt werden. Regelmäßig wird außer Glykose nur Lävulose gespalten; aus einem Molekül Zucker entstehen auch hierbei zwei Moleküle Säure.

3. Arabinose, Xylose, Galaktose und Saccharose werden anaerob nicht aufgespalten.

4. Es wird eine Mikrosaccharasebestimmung angegeben, bei der ein Molekül gespaltene Saccharose durch vier Moleküle CO_2 mit einer Genauigkeit $\pm$ 0,01 Mikromol CO_2 entsprechend $\pm$ 0,001 mg Saccharose nachgewiesen wird.

5. Die Methode der Lipasebestimmung von *Rona* und *Lasnitzki* wird für Bakterien ausgearbeitet.

6. Die Atmung der Bakterien ist von der Konzentration des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs abhängig, sie ist in höchster Annäherung proportional dem Logarithmus der O_2-Konzentration.

7. Die Atmung ist von der *h* innerhalb weiter Grenzen, 4,63 bis 7,37, unabhängig.

8. Bei höheren Glykosekonzentrationen sinkt die Atmung ab, der Grund ist in einer Zellschädigung durch die hypertonische Lösung zu suchen.

9. Bei der Untersuchung der Atmung in Lösungen von KCl, NaCl, $MgCl_2$ und $CaCl_2$ in verschiedenen Konzentrationen ist ein Optimum bei der $1\frac{1}{2}$fachen osmotischen Konzentration des Serums festzustellen, ebenso bei der anaeroben Glykolyse.

10. Der isoelektrische Punkt der Colibakterien liegt bei p_H 4,5.

11. Bei der Untersuchung verschiedener Atmungssubstrate lassen sich zwei große Gruppen unterscheiden, von denen die eine im Vergleich zur Glykose unabhängig von der Zahl der Zellen einen konstanten Q_{O_2} zeigt, die andere mit der Zahl der Zellen erheblich schwankt.

Bei der technischen Durchführung der Arbeit war die Mitarbeit von Fräulein *Lewin* von großem Wert.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. 152, 504, 1924. — 2) Ebendaselbst 174, 373, 1926. — 3) *Rona* und *Nicolai*, diese Zeitschr. 172, 82, 1926. — 4) Ebendaselbst 172, 212, 1926. — 5) Ebendaselbst 159, 72, 1925. — 6) Dtsch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 21. — 7) Eine Mitteilung über Bakterienkatalase und Mikrokatalasebestimmung erscheint demnächst.

Gas- und Stickstoffwechsel bei dem experimentellen Skorbut der Meerschweinchen.

Von

Natalie Jarussowa.

(Aus dem wissenschaftlichen Institut der Ernährungsphysiologie des Volksgesundheitskommissariats in Moskau.)

(Eingegangen am 22. September 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In unserer ersten Mitteilung[1]) haben wir gezeigt, daß:

1. bei der ausschließlichen Fütterung der Meerschweinchen mit Hafer, sogar in den Fällen, wo das Meerschweinchen den Hafer gern frißt und lange Zeit im Gewicht nicht abnimmt, die Stickstoffbilanz negativ wird und die Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs, parallel mit der Dauer der erwähnten Fütterung, sich verschlechtert.

2. Der Zusatz großer Dosen Kohls (40 g) macht die Stickstoffbilanz positiv und verbessert die Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs.

3. Kleine Kohldosen (10 bis 20 g) verhindern auf einige Zeit mehr oder weniger den Zerfall des Tierkörpers. Bei ihrer langdauernden Zugabe verschlechtert sich die N-Ausnutzung der Nahrung Hand in Hand mit der Verschlechterung des allgemeinen Zustandes des Tieres.

4. Die Quantität der N-Ausscheidung im Harn zeigt, daß die Kombination der Eiweißstoffe des Hafers und Kohls von dem Organismus besser angeeignet wird, als die Eiweißstoffe des Hafers allein.

Diese Untersuchung ist der Aufklärung des Ganges des Gasstoffwechsels bei Meerschweinchen mit der oben erwähnten Fütterung gewidmet. Von allen mir bekannten Veröffentlichungen über den Gaswechsel möchte ich mich etwas bei folgenden Arbeiten aufhalten: *Abderhalden*[2]), der die Ausscheidung der Kohlensäure untersuchte, hat gefunden, daß bei der Fütterung der Meerschweinchen mit einer Nahrung, die bei ihnen die Erkrankung an Skorbut hervorruft (Hafer, geschälte Erbsen), die CO_2-Ausscheidung sich nicht wesentlich ändert. Der Antiskorbutmittelzusatz zur Grundnahrung

---

[1]) *N. Schepilewskaja* und *N. Jarussowa*, diese Zeitschr. **167**, Heft 4/6, **1926**.

[2]) *Abderhalden*, Pflügers Arch. **191**, 1921.

blieb auf den Gaswechsel auch ohne Wirkung. Diese Mittel wurden dem Tiere nach dauernder Fütterung mit der oben erwähnten einseitigen Nahrung bei großer Gewichtsabnahme des Meerschweinchens, welche in einigen Versuchen 30 Proz. übertraf, gegeben. Man muß aber sagen, wie wir mehrmals bei unseren Versuchen beobachtet haben, daß in den Perioden, wo das Meerschweinchen schon viel am Gewicht verloren und der allgemeine Zustand des Tieres sich verschlechtert hat, der Zusatz sogar großer Dosen Kohls zum Hafer seine gewöhnlich günstige Wirkung nicht hervorruft. Dann finden wir bei *Asada*[1]) eine Anzeige, daß er bei einem Hunde, zu dessen avitaminoser Nahrung eine große Dosis Citronensaft (60 g anstatt der früher gegebenen 30 g) hinzugefügt wurde, eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet hat.

Endlich müssen wir die Arbeit von *Knipping* und *Kowitz*[2]) erwähnen. Diese Autoren untersuchten den Gaswechsel bei Menschen, die an Skorbut erkrankt waren. In den Perioden, wo der Gesundheitszustand es erlaubte, den Kranken autoklavisierte Nahrung zu geben, fanden sie bei Untersuchung des Grundwechsels dessen Erhöhung. Beim Citronensaft- oder Vitaminpräparatzusatz zur Grundnahrung wurde eine Erniedrigung des Grundwechsels beobachtet. Diese Erniedrigung in den Versuchen, auf welche sich die Autoren beziehen, war nicht bedeutend.

Indem wir jetzt zur Beschreibung unserer Versuche übergehen, halten wir es für notwendig zu bemerken, wie schwer es war, für die Versuche solch ein Tier zu wählen, welches den Hafer längere Zeit gefressen hätte, denn die Meerschweinchen weigern sich oft schon nach den ersten Tagen der einseitigen Fütterung, den Hafer zu fressen. Von den drei Versuchstieren weigerten sich zwei bald, die Nahrung zu verzehren, erlaubten nur kurzdauernde Versuche anzustellen, und nur das dritte gab die Möglichkeit, dauernde Beobachtungen zu machen. In unserer Darlegung wollen wir die Angaben für das letzte und auch für das eine von den beiden ersten Tieren anführen.

Die Methodik der Versuche.

Bei den Meerschweinchen wurde der Gaswechsel und auch der Stickstoffwechsel bestimmt. Die gegebene Nahrung wurde auf ihren Gehalt an Stickstoff analysiert. Die Menge der eingenommenen Nahrung wurde täglich bestimmt. Den ihnen mit Hilfe einer Pinzette gegebenen Kohl fraßen die Meerschweinchen begierig, und dabei entstand kein Verstreuen der Nahrung. Die Einrichtung des Käfigs, in welchem das Versuchstier sich befand, gestattete eine möglichst vollständige Trennung des Harns von dem Kote, welche beide täglich gesammelt und nach *Kjeldahl* für eine gewisse Periode, gewöhnlich für 3 Tage[3]), analysiert wurden. Die Respirationsversuche folgten nacheinander meistenteils nach 2 bis 3 Tagen und dauerten gewöhnlich 9 bis 10 Stunden. Sie wurden im *Schaternikoff*schen Respirationsapparat[4]) ausgeführt. Der CO_2-Gehalt in der Luft des Respirations-

[1]) *Asada*, Jahrb. d. Kinderheilk. 1924, Nr. 104.
[2]) *Knipping* und *Kowitz*, Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 2.
[3]) *N. Schepilewskaja* und *N. Jarussowa*, diese Zeitschr. 167, Nr. 4/6.
[4]) *M. Schaternikoff*, Pflügers Arch. 201, 1923.

apparats am Ende des Versuchs schwankte von 0,2 bis 0,4 Proz., nur in wenigen Fällen war er höher als die letzte Zahl. Der O_2-Gehalt wechselte in den Grenzen von 19 bis 20 Proz., meistens war er etwas mehr als 19 Proz. Die Analyse auf den CO_2-Gehalt wurde nach der Methode von *Pettenkoffer* in einer großen Probe entnommener Kammerluft ausgeführt, die Luftanalyse an O_2 — nach *Hempel.* Die relative Kammerluftfeuchtigkeit war am Ende des Versuchs durchschnittlich 50 Proz., in einigen Fällen stieg sie bis zu 75 Proz. Daß die Kammer hermetisch war, wurde durch das Berechnen des Stickstoffgehalts in der Luft der Kammer vor und nach dem Versuche kontrolliert. Die N-Differenzen schwankten gewöhnlich von 0 bis 0,5 Proz.; nur in einigen Fällen erreichten sie 0,9 Proz. Die Kammer des Respirationsapparats besteht aus einer Glasglocke, welche die Form eines Parallelepipedes hat und dessen Volumen etwa 54 Liter beträgt. Sie ist auf einem gußeisernen Untergestell der entsprechenden Form aufgestellt, wobei die Ränder der Glasglocke in eine auf dem Untergestell vorhandene, mit Quecksilber gefüllte, Rinne eingetaucht sind. Die Respirationsversuche folgten gewöhnlich nacheinander in 2 bis 3 Tagen; darum verzichteten wir auf die Bestimmung des „Grundwechsels“, weil wir in diesem Falle genötigt wären, das Tier oft und dauernd dem Hungern auszusetzen, was auf seinen Allgemeinzustand von Einfluß wäre und die erhaltenen Resultate verdunkelt hätte. Der Käfig, in welchem das Meerschweinchen sich befand, wurde in die Kammer gestellt. Das Tier konnte während des Versuchs den sich im Futternapf befindenden Hafer fressen. Der Kohl aber wurde ihm in zwei Dosen, vor und nach dem Versuch, gegeben. Durch die Glaswände der Kammer war es bequem das Betragen der Meerschweinchen zu beobachten: gewöhnlich bewegten sie sich wenig und schlummerten oft.

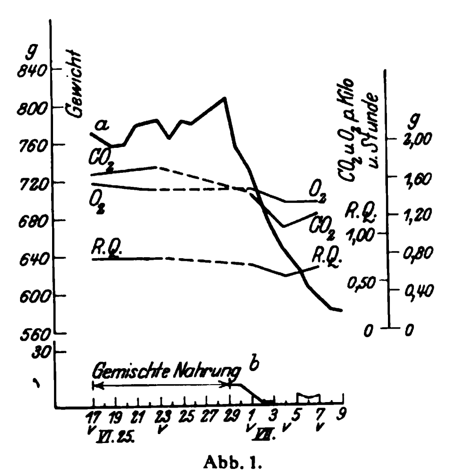


Abb. 1.

Meerschweinchen Nr. 1. *a* Gewicht des Tieres in Grammen. *b* die eingenommene Nahrung in Grammen. Mit der ununterbrochenen Linie ist der Hafer, mit der punktierten der Kohl bezeichnet. Mit *v* ist der Tag des Respirationsversuchs bezeichnet.

Der Verlauf der Untersuchung mit dem Meerschweinchen Nr. 1.

Die Untersuchung mit dem Meerschweinchen Nr. 1 dauerte nur 9 Tage (29. Juni bis 7. Juli 1925); bei gemischter Nahrung, welche aus Hafer, Möhren, Heu und Kohl bestand, wurden zwei Versuche in dem Respirations-

apparat angestellt (am 17. Juni und am 23. Juni). Da das Versuchstier sich ganz wohl auf dieser Diät fühlte und im Gewicht zunahm, so wurde es vom 29. Juni an auf die vorläufige Haferernährung übergeführt, welche 2 Tage dauerte. Das Meerschweinchen verzehrte pro Tag durchschnittlich 11 g Hafer; sein Anfangsgewicht (29. Juni) betrug 814 g. Vom 1. Juli an wurde das Sammeln des Harns und des Kots angefangen. Die Einnahme des Hafers von dem Meerschweinchen wurde immer geringer und vom 4. Juli an hörte es ganz auf den Hafer zu fressen. Sein Gewicht betrug am 4. Juli 645 g. Die Respirationsversuche wurden am 1. und am 4. Juli angestellt. Man muß sagen, daß man schon am dritten Tage der Haferfütterung die charakteristischen Veränderungen im Kote bemerken konnte: er nahm eine ungewöhnliche Form und eine dunklere Farbe an. In den drei darauf folgenden Tagen (5., 6. und 7. Juli) bekam das Meerschweinchen Kohl, aber es fraß nur wenig davon, durchschnittlich 5 g täglich; dabei fing es an einige Körner Hafer zu verzehren. Am dritten Tage nach dem Anfang der Kohlzugabe (7. Juli) wurde wieder ein Respirationsversuch angestellt. Das Gewicht des Meerschweinchens betrug am 7. Juli 595 g. An diesem Tage des Versuchs wurde bei dem Tiere eine Augenerkrankung bemerkbar, die sich in einer Art Lichtfurcht kundgab. Dann wurde es auf gemischte Nahrung gebracht und starb nach 2 Tagen, indem es 28,8 Proz. an Körpergewicht verloren hatte. Während der ganzen Untersuchungsperiode hatte das Tier fast gar kein Wasser getrunken. Die Sektion ergab keine bedeutenden pathologisch-anatomischen Veränderungen. Die Resultate der Respirationsversuche sind in der Tabelle I angeführt.

Tabelle I.

Zeitperioden und die Tage der Respirationsversuche	Durchschn. Tiergewicht pro Periode	Aufgenommene Futtermenge pro Tag		Aufgenommener N pro Tag		Gesamte N-Aufnahme	O_2 pro kg u. Std. (0° und 760 mm)	CO_2 pro kg u. Std. (0° und 760 mm)	R.-Q.
		Hafer	Kohl	Hafer	Kohl				
1925	g	g	g	g	g	g	g	g	
17. VI.	772	—	—	—	—	—	1,57	1,68	0,78
23. VI.	785	—	—	—	—	—	1,50	1,75	0,78
29.—30. VI.	784	11	—	0,16	—	0,16	—	—	—
1. VII.	733	7	—	0,11	—	0,11	1,50	1,46	0,71
2.—4. VII. 4. VII.	670	0,6	—	0,01	—	0,01	1,36	1,09	0,58
5.—7. VII. 7. VII.	610	0,15	5	0,002	0,011	0,013	1,35	1,22	0,66

Wie man aus Tabelle I ersehen kann, gaben die beiden Respirationsversuche, die bei gemischter Nahrung ausgeführt worden waren, sehr nahe Zahlen für den eingenommenen O_2, wie auch für die ausgeschiedene CO_2. In dem Versuch, welcher am dritten Tage der Haferfütterung (1. Juli) angestellt war, sinkt die CO_2-Ausscheidung, aber der O_2-Verbrauch bleibt derselbe. Am sechsten Tage der Haferfütterung (4. Juli) sinkt die CO_2-Ausscheidung noch tiefer, der O_2-Verbrauch sinkt auch, aber nicht so bedeutend. Dementsprechend erniedrigt sich auch stark der Respirationskoeffizient. Am dritten Tage der Kohlzugabe (7. Juli) wurde die CO_2-Ausscheidung verstärkt, der O_2-Verbrauch blieb aber auf demselben Niveau, wie im vorigen Versuch. Der Respirationskoeffizient wurde höher. Ob man diesen Effekt der Wirkung des Kohls als eigenartiger Nahrung zu-

schreiben solle, ist schwer zu entscheiden. Die Stickstoffbilanz blieb während des ganzen Versuchs mit diesem Tiere stark negativ.

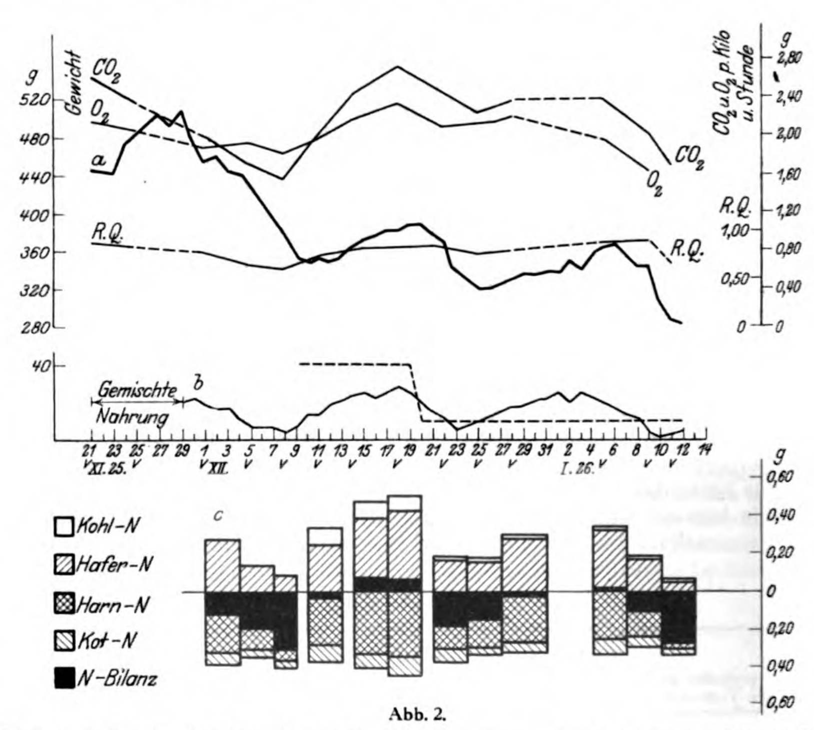


Abb. 2.

Meerschweinchen Nr. 3. *a* Gewicht des Tieres in Grammen. *b* die eingenommene Nahrung in Grammen. Mit der ununterbrochenen Linie ist der Hafer, mit der punktierten der Kohl bezeichnet. *c* Stickstoffwechsel; der Stickstoff in hundertsten Teilen eines Gramms. Mit ν ist der Tag des Respirationsversuchs bezeichnet.

Der Verlauf der Untersuchung mit dem Meerschweinchen Nr. 3.

Die Untersuchung mit dem Meerschweinchen Nr. 3 war länger; sie dauerte 45 Tage (29. November 1925 bis 12. Januar 1926) und war in Perioden eingeteilt worden, von denen jede gewöhnlich 3 Tage dauerte. Die Respirationsversuche wurden größtenteils in den mittleren Tagen dieser Perioden angestellt. Anfangs wurden sie (21. und 25. November) bei gemischter Fütterung ausgeführt. Vom 29. November an wurde das Meerschweinchen auf die vorläufige Haferfütterung übergeführt, welche 2 Tage dauerte. Sein Gewicht betrug am 29. November 508 g. Im Laufe der ersten 5 Tage der Haferfütterung (29. November bis 3. Dezember) fraß das Meerschweinchen den Hafer gern, durchschnittlich verzehrte es 16 bis 22 g täglich, und sein Gewicht sank nicht stark (508 bis 444 g). Dann fing aber sein Appetit zum Hafer abzunehmen an, das Meerschweinchen schälte den Hafer aus, der Kot wurde von ungewöhnlicher Form, dunklerer Farbe und bekam einen spezifischen unangenehmen Geruch. Das Tier fing an stark zu haaren. Während der 10 Tage der ausschließlichen Hafer-

fütterung wurden drei Respirationsversuche angestellt (1., 5. und 8. Dezember). Vom 9. bis 19. Dezember bekam das Versuchstier Hafer mit einem Zusatz von 40 g Kohl. Diese Dosis übte ihre gewöhnliche günstige Wirkung auf das Meerschweinchen aus: sein Appetit zum Hafer hob sich wieder (die Menge des verzehrten Hafers stieg von 7 g bis zu 27 g täglich), sein Gewicht nahm zu — von 352 g (9. Dezember) bis zu 386,5 g (19. Dezember) —, es hörte auf zu haaren und die Form des Kotes bekam wieder das normale Aussehen. Während der 11 Tage dieser Fütterung wurden drei Respirationsversuche angestellt (11., 14. und 18. Dezember). Dann, vom 20. Dezember an, fing man an dem Meerschweinchen nur 10 g Kohl zu geben. Diese Dosis wirkte zuerst nicht günstig auf den Zustand des Tieres: sein Appetit zum Hafer sank, sein Gewicht fing an abzunehmen, der Kot änderte wieder seine normale Form. Hierzu gehört ein Respirationsversuch (22. Dezember). Vom 24. Dezember an stieg aber beim Meerschweinchen wieder der Appetit zum Hafer und sein Gewicht fing an wieder zuzunehmen. Während dieser Zeit (24. Dezember 1925 bis 6. Januar 1926) wurden drei Respirationsversuche (25., 28. Dezember **1925** und 5. Januar 1926) angestellt. Vom 7. Januar 1926 an fing die abermalige Gewichtsabnahme des Meerschweinchens an, welche von der Appetitsabnahme für den Hafer und einer sichtigen Verdauungsverschlimmerung gefolgt wurde. Der letzte Zustand dauerte bis zum Ende der Untersuchung, d. h. bis zum 12. Januar. Das Gewicht des Meerschweinchens betrug am 7. Januar 354 g und am 12. Januar 283 g. Manchmal schrie es bei der Futteraufnahme, schluckte es schwer herunter, würgte sich; die Augen wurden trübe. Hierzu gehören zwei Respirationsversuche (9. und 11. Januar). Bis zum 13. Januar hatte das Meerschweinchen 45 Proz. seines Gewichts verloren und wurde auf gemischte Nahrung übergeführt. Die erhaltenen Resultate der Untersuchung des Gas- und Stickstoffwechsels und der Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs sind in der Tabelle II angeführt.

Wie man aus dieser Tabelle sehen kann, geben die zwei Respirationsversuche bei der gemischten Nahrung (21. und 25. November) sehr nahe Zahlen für O_2 und etwas weniger stimmende Zahlen für CO_2. Die Resultate der drei Respirationsversuche während der ausschließlichen Haferfütterung (1., 5. und 8. Dezember) zeigen, daß der O_2-Verbrauch sinkt, aber bedeutend schwächer als die CO_2-Ausscheidung; die letztere sank von durchschnittlich 2,48 (bei gemischter Fütterung) bis auf 1,54 g pro Kilogrammstunde (am Ende der Fütterung). Dementsprechend sinkt der Respirationskoeffizient bis auf 0,61. Drei Respirationsversuche, die angestellt wurden, als das Meerschweinchen als Zusatz zum Hafer 40 g Kohl bekam (11., 14. und 18. Dezember), gaben eine starke Erhöhung des O_2-Verbrauchs, wie auch der CO_2-Ausscheidung; besonders steigt die letztere (von 1,54 bis zu 2,71). Der Respirationskoeffizient kehrt zum Werte, der bei gemischter Nahrung festgestellt wurde, zurück (0,8). Die folgenden vier Versuche (22., 25., 28. Dezember **1925** und 5. Januar 1926) waren angestellt in der Periode, als man zum Hafer 10 g Kohl zugab. Der O_2-Verbrauch wie auch die CO_2-Ausscheidung bleiben auf einem hohen Niveau (CO_2 2,23 bis 2,42, O_2 2,08 bis 2,20 g pro Kilogrammstunde), obgleich die Menge der eingenommenen Nahrung stark gesunken ist. Nur in dem vierten Versuch sehen wir eine Erniedrigung des O_2-Verbrauchs bis zu 1,95 g pro Kilogrammstunde. Die letzten zwei Respirationsversuche wurden zu der Zeit ausgeführt, als das Meerschweinchen, welches fortlaufend seine 10 g Kohl bekam, sich schon schlecht zu fühlen und im Gewicht abzunehmen anfing, und gaben eine Erniedrigung in der

Tabelle II.

Nr.	Zeitperioden und die Tage der Respirationsversuche		Durchschnittl. Tiergewicht pro Periode	Aufgenommene Futtermenge pro Tag		Aufgenommener N pro Tag		Gesamte N-Aufnahme	N im Harn pro Tag	N im Kot pro Tag	Gesamte N-Ausscheidung	N-Bilanz	Unausgenutzter Nahrungs-N	O_2 pro kg und Std. (0° und 760 mm)	CO_2 pro kg und Std. (0° und 760 mm)	R.-Q.
	1925			Hafer	Kohl	Hafer	Kohl									
			g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	Proz.	g	g	
		21. XI.	444	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,15	2,61	0,88
		25. XI.	481	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,03	2,34	0,84
	29.—30. XI.		492	21	—	0,32	—	0,32	—	—	—	—	—	—	—	—
1.	1.—3. XII.	1. XII.	452	17	—	0,279	—	0,279	0,32	0,065	0,385	—0,106	23,32	1,87	1,98	0,77
2.	4.—6. XII.	5. XII.	426	8	—	0,139	—	0,139	0,307	0,037	0,344	—0,205	26,85	1,92	1,69	0,64
3.	7.—8. XII.	8. XII.	381	6	—	0,089	—	0,089	0,356	0,045	0,401	—0,312	50,41	1,82	1,54	0,61
4.	10.-12. XII.	11. XII.	350	16	40	0,245	0,091	0,336	0,284	0,085	0,369	—0,033	25,65	1,97	2,00	0,73
5.	14.-16. XII.	14. XII.	371	24	40	0,389	0,09	0,479	0,326	0,077	0,403	+ 0,076	16,04	2,17	2,42	0,81
6.	17.-19. XII.	18. XII.	381	26	40	0,424	0,083	0,507	0,344	0,094	0,438	+ 0,069	18,63	2,34	2,71	0,84
7.	21.-23. XII.	22. XII.	362	11	10	0,167	0,02	0,187	0,299	0,069	0,368	—0,181	37,14	2,08	2,42	0,85
8.	24.-26. XII.	25. XII.	324	10	10	0,158	0,02	0,178	0,294	0,039	0,333	—0,155	21,89	2,12	2,23	0,76
9.	27.-30. XII.	28. XII.	331	18	10	0,280	0,02	0,3	0,271	0,049	0,32	—0,020	16,48	2,20	2,38	0,79
	1926															
10.	4.—6. I.	5. I.	363	19	10	0,328	0,012	0,34	0,247	0,085	0,332	+ 0,008	25,2	1,95	2,39	0,89
11.	7.—9. I.	9. I.	347	9	10	0,166	0,012	0,178	0,240	0,052	0,292	— 0,114	29,61	1,63	2,01	0,90
12.	10.-12. I.	11. I.	293	3	10	0,049	0,012	0,061	0,298	0,029	0,327	—0,266	48,17	?	1,68	0,65 (?)

CO_2-Ausscheidung, welche in dem letzten Respirationsversuche bis auf 1,68 gesunken war. In dem ersten dieser Versuche haben wir auch ein Sinken des O_2-Verbrauchs. Leider erlaubte in dem letzten Versuche ein Mißlingen in der Analyse nicht die Zahl des O_2-Verbrauchs genau zu bestimmen, aber bei annähernder Bestimmung desselben konnte kein weiteres Sinken festgestellt werden und der Respirationsquotient ist etwa 0,65.

Was den Stickstoffumsatz betrifft, so sieht man aus der Tabelle II, daß bei ausschließlicher Haferfütterung die Stickstoffbilanz immer stärker negativ wird und die N-Ausnutzung der Nahrung immer schlechter wird. Der Prozentsatz des unausgenutzten Stickstoffs der Nahrung beträgt in der ersten Periode 23,2 und in der dritten 50,4 Proz. Die letzte Zahl scheint uns nicht genügend korrekt zu sein, weil der Kot in dieser Periode nur während 2 Tagen gesammelt wurde und bei dem unregelmäßigen Kotausscheiden bei den Meerschweinchen dies einen Fehler in das Endresultat eintragen könnte. In den Perioden mit dem Zusatz von 40 g Kohl zum Hafer (4., 5. und 6.) wird die Stickstoffbilanz positiv, die Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs wird besser und der Prozentsatz der Nichtausnutzung desselben sinkt bis zu 16 Proz. Die Abnahme des Kohlzusatzes bis auf 10 g (in der siebenten Periode) wirkte im Anfang, wie schon bemerkt worden war, nicht günstig auf den Zustand des Versuchstiers und rief eine starke Verschlimmerung in der Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs hervor. Dann aber, in der achten und neunten Periode, bei derselben Zugabe von Kohl, verkleinerte sich das N-Defizit und ging sogar in der zehnten Periode in die N-Retention über. Am Versuchsende (elfte und zwölfte Periode) wird die Stickstoffbilanz wieder negativ und der Prozentsatz der Nichtausnutzung des N erhöht sich. Zum Schluß möchten wir hier Herrn Prof. *M. N. Schaternikoff* unseren tiefsten Dank für seine Leitung und stetige Hilfe aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Bei der einseitigen Haferfütterung in der Periode der Abnahme des Appetits zum Hafer (wie es in unseren Versuchen mit beiden Meerschweinchen, besonders mit dem Meerschweinchen Nr. 1, Platz hatte), sinkt der O_2-Verbrauch und die CO_2-Ausscheidung, wobei letztere in einem bedeutend stärkeren Grade abnimmt.

2. Die Zugabe großer Kohldosen erhöht den O_2-Verbrauch und besonders die CO_2-Ausscheidung dauernd.

Dieselbe Wirkung zeigen auch kleine Dosen (10 g, Versuch mit Meerschweinchen Nr. 3), aber nur auf kurze Zeit.

3. Was den Stickstoffwechsel und die Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs anbetrifft, so sind die in der Untersuchung mit dem Meerschweinchen Nr. 3 festgestellten Resultate in vollem Einklang mit den früher beschriebenen Versuchen[1]).

[1]) *N. Schepilewskaja* und *N. Jarussowa*, diese Zeitschr. 167, Nr. 4/6, 1926.

Der Gaswechsel bei normalen und der großhirnhemisphärenberaubten Tauben.

Von

O. Moltschanowa.

(Aus dem Institut der Ernährungsphysiologie des Volksgesundheitskommissariats in Moskau.)

(Eingegangen am 22. September 1926.)

Das Studium des Gaswechsels bei einigen physiologischen und pathologischen Zuständen des Tierorganismus war die Ursache, daß wir eine ziemlich große Anzahl von Gaswechselversuchen an normalen Tauben ausgeführt haben.

Diese Versuche wurden im *Schaternikoff*schen Respirationsapparat angestellt; die Kammer dieses Apparats für kleine Tiere besteht aus einem viereckigen, gußeisernen Untergestell, dessen Ränder mit einer Rinne versehen sind; in diese mit Quecksilber ausgefüllte Rinne wird eine 42 × 24 × 50 cm große Glasglocke eingesetzt. Am Kammerboden befinden sich einige Öffnungen, worin Röhren zur Verbindung der Kammer mit den übrigen Teilen des Apparats eingesetzt sind. Die Ventilation des Apparats ist derartig eingerichtet, daß die Zusammensetzung der Kammerluft am Ende des Versuchs gänzlich genügend war; der CO_2-Gehalt übertrifft nicht 0,2 Proz., in den meisten Fällen aber schwankt er zwischen 0,08 bis 0,1 Proz. Daß der Apparat hermetisch war, konnte man nach dem Stickstoffgehalt in der Kammerluft am Anfang und am Ende des Versuchs beurteilen. Gewöhnlich schwankt der Unterschied in der Quantität des Stickstoffs zwischen 0,02 bis 0,05 Proz. und übertrifft in den schlimmsten Fällen nicht 0,5 Proz. In unseren Versuchen wurden gewöhnlich Tauben von etwa 300 g genommen, die vorläufig während einer bestimmten Zeit mit gemischtem Futter (Buchweizen, Erbsen) ernährt wurden.

Vor dem Respirationsversuchstage (18 bis 20 Stunden vor dem Anfang des Versuchs) wurde das Futter aus dem Käfig, wo das Tier

lebte, herausgenommen, und die Versuche, welche 10 Stunden dauerten, wurden stets mit nüchternen Tauben ausgeführt. Dessenungeachtet bemerkten wir nach einigen Versuchen, daß der O_2-Verbrauch und die CO_2-Ausscheidung bei demselben Vogel bedeutenden Schwankungen unterworfen waren. Um die Grenzen dieser Schwankungen festzustellen, mußte man eine große Anzahl von Versuchen ausführen (etwa 30).

Während dieser Versuche beobachteten wir das Benehmen der Tauben und kamen zu dem Schluß, daß die Ursache der beobachteten Gaswechselschwankungen wahrscheinlich in äußeren Reizungen, besonders in der Sehreizung liege. Wenn jemand ins Zimmer trat, begannen die Tauben sich unruhig zu bewegen, und zuweilen versuchten sie sogar aufzufliegen.

Tabelle I.

Nr.	Datum	Körpergewicht	Gesamt-O_2-Verbrauch für 10 Std.	Gesamt-CO_2-Ausscheidung für 10 Std.	Volumen auf 100 g u. Std. (0° — 760 mm)		Menge auf 100 g u. Std.		R.-Q.
					O_2	CO_2	O_2	CO_2	
	1925		ccm	ccm	ccm	ccm	g	g	
1	1. X.	305	5015	3635	164,4	119,1	0,233	0,234	0,73
1	5. X.	306	4511	3441	147,4	112,4	0,209	0,221	0,76
2	9. X.	344	5880	4532	171,2	131,7	0,243	0,259	0,77
2	13. X.	344	6015	4268	174,9	124,0	0,248	0,244	0,73
3	15. X.	315	5335	3691	169,2	117,1	0,240	0,230	0,69
3	19. X.	315	4976	3523	157,9	114,0	0,224	0,224	0,72
4	23. X.	348	5841	4325	167,7	124,2	0,238	0,243	0,74
4	26. X.	324	5103	3380	157,5	104,6	0,224	0,205	0,66
5	5. XI.	287	4900	3038	170,7	105,8	0,242	0,207	0,62
5	9. XI.	308	5309	3563	172,3	115,8	0,245	0,228	0,67
5	11. XI.	310,2	6293	4371	202,8	140,9	0,288	0,276	0,69
5	30. XI.	244	4427	2701	186,0	110,7	0,264	0,216	0,61
5	17. XII.	286	4378	3203	153,1	115,4	0,217	0,228	0,73
5	30. XII.	289	4457	3250	154,2	112,1	0,219	0,220	0,73
	1926								
5	27. I.	286	4378	2977	153,0	104,1	0,217	0,204	0,66
	1925								
6	17. XI.	284	4187	3229	147,3	113,1	0,209	0,222	0,77
6	9. XII.	273	4059	3063	149,8	112,2	0,213	0,220	0,75
6	15. XII.	278	4204	3152	151,2	113,4	0,215	0,222	0,74
6	29. XII.	275	4055	2866	147,4	104,2	0,209	0,204	0,71
	1926								
7	2. I.	323	5717	4266	177,0	132,0	0,251	0,259	0,76
7	4. I.	326	5446	3666	167,0	112,4	0,237	0,220	0,68
7	8. I.	319	5320	4049	166,7	126,9	0,236	0,249	0,76
7	11. I.	325	5124	3628	157,7	111,6	0,224	0,219	0,71
7	13. I.	315	4745	3169	150,6	100,6	0,214	0,197	0,68
7	25. I.	317	4360	3407	137,5	107,5	0,195	0,211	0,78
7	1. II.	317,5	5704	4412	179,6	138,9	0,255	0,272	0,71
7	8. II.	314	5673	4497	180,6	143,2	0,256	0,281	0,79
	1925								
13	11. X.	312	5170	3263	165,7	104,6	0,235	0,205	0,63

Tabelle II.

Die verdunkelte Respirationskammer.

Nr.	Datum	Körpergewicht	Gesamt-O_2-Verbrauch für 10 Std.	Gesamt-CO_2-Ausscheidung für 10 Std.	Volumen auf 100 g u. Std. (0° — 760 mm)		Menge auf 100 g u. Std.		R.-Q.
					O_2	CO_2	O_2	CO_2	
	1926		ccm	ccm	ccm	ccm	g	g	
5	5. II.	309	4327	3135	140,0	101,4	0,200	0,193	0,72
5	24. II.	317	4588	2771	144,4	87,4	0,205	0,172	0,60
7	17. II.	317	4656	3031	146,8	95,6	0,208	0,187	0,65
7	26. II.	300	4228	2881	140,7	96,0	0,199	0,188	0,68
7	1. III.	315	4645	2939	147,4	93,3	0,209	0,183	0,63
8	27. I.	368,5	5484	3874	148,8	105,1	0,211	0,206	0,70
8	3. II.	374	5704	3583	152,5	95,8	0,217	0,188	0,63
8	19. II.	365	5177	3134	141,8	85,8	0,201	0,171	0,60
8	3. III.	381	5401	3477	141,7	91,2	0,201	0,179	0,64
9	17. III.	253	3671	2495	145,3	98,6	0,206	0,193	0,68
9	23. III.	277	4044	2753	146,0	99,4	0,207	0,195	0,68
9	2. IV.	277	4086	2737	147,5	98,8	0,209	0,194	0,67
9	5. IV.	274	4014	2718	146,5	99,2	0,208	0,194	0,67
10	27. III.	305	3930	2717	128,8	89,1	0,183	0,175	0,69
10	30. III.	300	3903	2685	130,1	89,5	0,185	0,175	0,69
14	25. VI.	315	4173	2920	132,5	92,7	0,189	0,182	0,70
14	29. VI.	315	4148	2873	131,7	90,9	0,188	0,178	0,69
15	2. VII.	324	4390	3217	135,5	99,3	0,192	0,194	0,73

Bei den Versuchen wurde letzteres in Betracht gezogen und die Kammer an allen Seiten mit einer dunklen Hülle bekleidet.

Schon beim ersten unter diesen Bedingungen ausgeführten Versuch wurde eine Herabsetzung des Gaswechsels erwiesen, und die folgenden Versuche zeigten, daß die Zahlen für den O_2-Verbrauch sowie für die CO_2-Ausscheidung viel konstanter wurden.

Nach den vorhergehenden Tabellen I und II kann man den Gaswechsel in den Versuchen mit und ohne Verdunkelung beurteilen.

Diese Tabellen zeigen uns, daß der Gaswechsel bei allen Tauben nach Verdunklung gesunken ist und die Gaswechselzahlen bei ein und derselben Taube ziemlich konstant sind, obgleich die individuellen Schwankungen blieben. Es wurde beobachtet, daß die individuellen Schwankungen im Gaswechsel fast immer vorhanden sind, und daß die Rasse dabei einen gewissen Einfluß hat; bei weißen Tauben ist z. B. der Gaswechsel geringer als bei den wilden. Wahrscheinlich spielt dabei auch das Alter eine gewisse Rolle, doch das Alter der Taube war uns meistens unbekannt.

Während unserer Arbeit wandte sich der Professor der Tomsker Universität, *N. A. Popoff*, an das hiesige Institut mit der Bitte, einige Gaswechselversuche anzustellen mit den Tauben, bei denen die Groß-

hirnhemisphären exstirpiert waren. Nach dem Vorschlag von Professor *M. N. Schaternikoff* wurden Versuche mit fünf von Professor *N. A. Popoff* operierten Tauben angestellt. Drei dieser Tauben wurden zuerst als normale untersucht, und die dabei erhaltenen Zahlen kann man in der Tabelle II, Nr. 14 und 15, und in der Tabelle I, Nr. 13, finden.

Drei Tauben wurden von uns in der ersten Periode unserer Arbeit untersucht, d. h. alle Versuche sowohl mit normalen als auch mit operierten Tauben wurden in unverhüllten Kammern ausgeführt; zwei andere aber, welche wir später erhalten haben (Nr. 14 und 15), befanden sich vor und auch nach der Operation in einer verhüllten Kammer.

Tabelle III.

Nr.	Datum	Körpergewicht	Gesamt-O_2-Verbrauch für 10 Std.	Gesamt-CO_2-Ausscheidung für 10 Std.	Volumen auf 100 g u. Std. (0° — 760 mm)		Menge auf 100 g u. Std.		R.-Q.
					O_2	CO_2	O_2	CO_2	
	1925		ccm	ccm	ccm	ccm	g	g	
11	31. X.	280	3634	2503	129,8	89,4	0,184	0,175	0,68
12	13. XI.	248	3496	2262	141,0	91,2	0,200	0,179	0,65
13	19. XI.	266	3854	2463	144,9	92,6	0,206	0,181	0,64
	1926								
14	6. VII.	272	3395	2296	124,1	84,4	0,177	0,165	0,68
14	16. VII.	272	3411	2386	125,4	88,1	0,179	0,173	0,70
14	23. VII.	257	3311	2287	128,8	89,0	0,184	0,174	0,69
15	9. VII.	266	3344	2173	125,7	81,7	0,178	0,160	0,69
15	13. VII.	264	3126	2188	118,4	82,9	0,168	0,162	0,70
15	20. VII.	262	3251	2130	124,1	81,3	0,175	0,159	0,65
15	27. VII.	261	3205	2179	122,8	83,5	0,174	0,164	0,68

Die Tabelle III zeigt uns, daß der Gaswechsel bei operierten Tauben entweder derselbe wie bei den Tauben in der verdunkelten Kammer oder etwas geringer ist. Man darf glauben, daß die Herabsetzung des Gaswechsels hier infolge derselben Gründe wie bei der Verhüllung der Kammer auftritt, aber bei der Entfernung eines so wichtigen Teiles des Zentralnervensystems, wie der Großhirnhemisphäre, fehlt die Reaktion wie auf Seh- so auch auf andere Reize.

Diese Überzeugung finden wir noch mehr in dem Umstand bestätigt, daß bei der Entfernung nur der einen Hemisphäre keine Veränderung des Gaswechsels auftritt. Der Taube 12 wurde zuerst nur eine Hemisphäre entfernt, und dabei bekamen wir folgende Zahlen.

Nr.	Datum	Körpergewicht	Gesamt-O_2-Verbrauch für 10 Std.	Gesamt-CO_2-Ausscheidung für 10 Std.	Volumen auf 100 g u. Std. (0° — 760 mm)		Menge auf 100 g u. Std.		R.-Q.
					O_2	CO_2	O_2	CO_2	
			ccm	ccm	ccm	ccm	g	g	
12	29. X.	277	4187	3229	151,1	116,5	0,214	0,228	0,77

Diese Zahlen sind denen der Tabelle I sehr nahe, dagegen sind die nach der Entfernung der zweiten Hemisphäre erhaltenen und in der Tabelle III, Nr. 12, angezeigten Zahlen charakteristisch für die Versuche mit der Verdunklung (Tabelle II).

Zum Schluß erlaube ich mir, meinen innigsten Dank Herrn Prof. *Schaternikoff* darzubringen, der mir während der Versuche ständig Rat gegeben und Hilfe geleistet hat, ebenfalls Herrn Prof. *N. A. Popoff* für das uns dargebotene interessante Material.

Über den Ammoniakstoffwechsel der normalen und der mit Blausäure vergifteten Extremität.

Von

A. Bornstein und **K. Keitel.**

(Aus dem pharmakologischen Institut der Hamburger Universität, Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 23. September 1926.)

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Fragen, die die Physiologie des Ammoniakstoffwechsels betreffen, der Klärung nähergeführt worden.

Nachdem von *Folin* und *Denis* zuerst eine einwandfreie Methode zur Bestimmung des Ammoniakgehalts im Blute angegeben war, haben als erste *Nash* und *Benedict*[1]) sich mit der Frage des Ammoniakstoffwechsels beschäftigt. Sie fanden, daß im Blute der Nierenvenen sich mehr Ammoniak findet, als im Blute der Nierenarterien, und sie schreiben daher der Niere eine wichtige Rolle nicht nur für die Ausscheidung, sondern auch für die Bildung des Ammoniaks zu. *Bliss*[2]) bestätigt die Resultate von *Nash* und *Benedict*, findet aber, daß auch in anderen Organen Ammoniak gebildet wird, so im Pankreas und auch in der Milz, während *Parnas* und *Kliesiecky*[3]) zeigen, daß der Darm eine bedeutende, vielleicht die bedeutendste Quelle des Ammoniaks beim normalen Kaninchen ist. Auch im Blute selbst, namentlich im Blute, das aus den Gefäßen entfernt worden ist, fanden *Parnas* und *Heller*[4]) eine Bildung beträchtlicher Mengen von Ammoniak. Von Organen, die Ammoniak „zerstören", also wohl in Harnstoff umwandeln, ist es den letztgenannten Autoren nur gelungen, die Leber nachzuweisen.

Über das Organ, das den größten Teil des Körpers des Menschen und der Säugetiere einnimmt, über die Muskulatur, sind genauere Versuche bisher nicht vorhanden, außer einer gelegentlichen Angabe von *Bliss*, der den NH_3-Gehalt in der V. femoral. manchmal geringer findet als in der A. femoral.

---

[1]) Journ. of biol. Chem. 48, 463, 1921.
[2]) *Bliss*, ebendaselbst 67, 109, 1926.
[3]) Diese Zeitschr. 173, 224, 1926.
[4]) Ebendaselbst 152, 1, 1924.

Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, das Verhalten des Ammoniaks in der künstlich durchströmten hinteren Extremität des Hundes zu untersuchen.

Methodik.

Zur Bestimmung des Ammoniakgehalts im Blute benutzten wir die von *Parnas* und *Heller*[1]) angegebene Apparatur. Wir veränderten diese, indem wir dem Dampf aus dem Entwickler außer durch den Hahn A (s. Abbildung, diese Zeitschrift **152**, 6, 1924) noch durch einen zweiten Hahn, der in Höhe der Schlauchverbindung eingeschaltet wurde, strömen ließen. Hierdurch wird der Vorteil gewonnen, den Hahn A, der ja nur eine ganz bestimmte Menge Dampf hindurchtreten lassen darf und entsprechend gedrosselt werden muß (da der Kühler sonst den Dampf nicht genügend kondensiert und außerdem die Vorlage überspritzt), in der als günstig befundenen Stellung unverändert stehenzulassen und die Unterbrechung des Dampfstroms lediglich durch den neuen Hahn vorzunehmen.

Zur Bestimmung des Ammoniaks wurde so verfahren, daß der Apparat erst ammoniakfrei gemacht wurde und dann 2 ccm eines Ammonsulfatstandards (1 ccm = 0,002 mg N) überdestilliert wurden. Wurden diese quantitativ wiedergefunden, so wurde zur eigentlichen Analyse übergegangen:

2 ccm aus dem Durchblutungsstrom frisch entnommenen Blutes wurden bei D in der von *Parnas* beschriebenen Weise eingegeben und durch Öffnen des neuen Hahnes der Wasserdampfdestillation unterworfen. Nachdem einige Kubikzentimeter überdestilliert waren, wurde die Vorlage gewechselt und einige Kubikzentimeter weiter überdestilliert. Eine dritte Destillation erwies sich stets als überflüssig, da dann bereits alles Ammoniak übergegangen war. Ebenso ergab die vorgeschriebene nachfolgende Standarddestillation immer sehr zufriedenstellende Werte, so daß bei den späteren Versuchen, besonders als uns daran lag, in möglichst kurzen Intervallen Bestimmungen vorzunehmen, auch diese unterlassen und lediglich am Schluß vorgenommen wurden.

Eine bequeme Art der Reinigung des Apparats sei hier noch erwähnt, die den Vorteil hat, sehr schnell vor sich zu gehen, ohne daß die Gefahr der Beschädigung des Apparats vorliegt, da der Apparat selbst nicht auseinandergenommen wird: Nachdem das Vakuum abgestellt ist, wird der zweite Hahn zugedreht, bei D Luft eingelassen, der die Vorlage tragende Pfropfen herausgenommen, die Vorlage in Sicherheit gebracht und nun hinter dem neuen Hahn die Schlauchverbindung gelöst. Ist dies geschehen, braucht nur an dieser Stelle Wasser in den Apparat gespritzt und wieder herausgesaugt zu werden. Das Spülen wird zweimal wiederholt. Ist durch irgend einen Anlaß das Blut übergeschäumt, so kann der ganze Apparat

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 1, 1924; **155**, 247. 1925.

gereinigt werden, indem bei *S* ein Schlauch aufgesteckt wird, der mit der Spritzflasche verbunden ist. Saugt man dann bei *S* Wasser hindurch, so ist der Apparat in 1 bis 2 Minuten wieder völlig rein.

Im übrigen haben wir uns genau an die Vorschrift von *Parnas* und *Heller* (diese Zeitschr. **152**, **1 ff.**, **1924**) gehalten.

Die Versuche wurden an der überlebenden hinteren Extremität des Hundes angestellt. Die Extremität wurde mit defibriniertem Blute von der Aorta abdominalis aus in einer Weise durchströmt, die kürzlich von dem einen von uns[1]) näher beschrieben worden ist. Untersucht wurde der Ammoniakgehalt des durchgeströmten Blutes. Dieses Blut enthielt relativ große Ammoniakmengen, da es aus technischen Gründen, die in der angeführten Arbeit näher auseinandergesetzt sind, erst 4 bis 24 Stunden nach dem Defibrinieren benutzt wurde.

So schwankt der Ammoniakgehalt am Beginn unserer Versuche von 0,15 bis 1,0 mg-Proz., während normales Hundeblut nach *Parnas* und *Heller*[2]) nur 0,03 bis 0,06 mg-Proz. enthält.

Ergebnisse.

Wir haben in dieser Weise sieben Versuche angestellt, die alle übereinstimmend das gleiche Resultat zeigten (Tabelle I). In allen Versuchen

Tabelle I.

Extremität.

Datum 1925	Dauer der Durchblutung Stunden	NH_3=N mg-Proz.	Extremität kg	Blutvolumen Liter	Gesamtabnahme	mg/kg/Stdn.
17. VI.	0 1 2	1,05 0,26 0,68	8,10	4,5	— 39,2	— 2,42
25. VI.	0 1 2	2,20 1,43 1,65	7,73	4,5	— 42,7	— 2,77
19. VIII.	0 1	0,37 0,15	3,50	4,5	— 9,9	— 2,80
7. X.	0 1	0,38 0,18	3,45	4,5	— 9,0	— 2,61
4. XI.	0 1	0,49 0,21	5,00	4,5	— 12,6	— 2,51
1926 23. VI.	0 1 2	0,48 0,24 0,20	3,72	4,5	— 12,6	— 1,70
21. VII.	0 1	0,34 0,10	7,57	4,5	— 10,8	— 1,42

[1]) *Bornstein*, Arch. f. exper. Pathol. **115**, 367. 1926.

[2]) Diese Zeitschr. **169**, 255. 1926.

nämlich sinkt der Gehalt des Blutes an Ammoniak im Verlauf von 1 bis 2 Stunden auf Werte, die nur 50 bis 20 Proz. des ursprünglichen Ammoniakgehalts betragen. Die verschwundenen Ammoniakmengen sind also sehr erheblich. Wir haben die Zahlen, um Vergleiche zu bekommen, auf Kilogramm Extremität und Stunde umgerechnet. Es ergaben sich Resultate, die sich im allgemeinen in der Größenordnung vergleichen lassen. Es verschwinden pro Kilogramm/Stunde etwa 2 mg Ammoniak.

Einige Versuche, bei denen Insulin zugesetzt wurde, s. Tabelle II, geben im wesentlichen das gleiche Resultat des Verschwindens des Ammoniaks.

Tabelle II.

Extremität + Insulin.

Datum 1925	Dauer der Durchblutung Stunden	NH_3=N mg-Proz.	Extremität kg	Blutvolumen Liter	Gesamtabnahme	mg/kg/Stdn.
15. X.	0 1	0,37 0,14	4,20	4,5	— 10,3	— 2,46
21 X.	0 1	0,16 0,05	6,80	4,5	— 4,9	— 0,72
27. X.	0 1	0,18 0,04	9,35	4,5	— 6,3	— 0,68

Immerhin möchten wir darauf aufmerksam machen, daß die relativ gute Übereinstimmung der Versuche, was die quantitativen Verhältnisse anlangt, wohl nur zufällig ist. Die Menge des Ammoniaks, die verschwindet, wird sicherlich doch davon abhängen, welche Ammoniakmenge zu Beginn des Versuchs vorhanden war. Wäre also nur die Spur Ammoniak in unserem Durchströmungsblut gewesen, die sich normalerweise im strömenden Blute befindet, so würden, sogar wenn die letzte Spur Ammoniak verschwunden wäre, so große Ammoniakmengen eben nicht von der Extremität verarbeitet sein. Sicherlich wird man unter Umständen pro Kilogramm/Stunde auch andere Werte erhalten.

Von anderen Organen, die bisher untersucht sind, wird nur von der Leber angenommen, daß sie Ammoniak zum Verschwinden bringt, und wir haben daher eine Kombination von Extremität und Leberpräparat angewandt, um zu untersuchen, ob durch die Leber vielleicht noch größere Ammoniakmengen verarbeitet werden als durch die Extremität. Die auf Kilogramm umgerechneten Werte des verschwundenen Ammoniaks sind jedenfalls nicht größer, eher kleiner als am Extremitätenpräparat, so daß wir zunächst nicht sagen können, daß durch Hinzutun einer durchströmten Leber zum Extremitätenpräparat

die Ausnutzung des Ammoniaks verbessert wird (Tabelle III). Dagegen scheint in einigen Fällen der prozentuale Ammoniakgehalt des Blutes unter dem gleichzeitigen Einfluß von Leber und Extremität auf noch niedrigere Werte zu sinken als unter dem Einfluß der Extremität allein. Unbedingt beweisend in der einen oder anderen Richtung sind diese Versuche aber nicht.

Tabelle III.

Extremität + Leber.

Datum 1925	Dauer der Durchblutung Stunden	NH_3=N mg-Proz.	Extremität kg	Blutvolumen Liter	Gesamtabnahme	mg/kg/Stdn.
24. VI.	0	0,70	5,70	4,5	— 19,8	— 1,74
	1	0,26				
	2	—				
3. VII.	0	0,40	9,85	4,5	— 13,5	— 0,68
	1	0,20				
	2	0,10				
22. VI.	0	0,22	2,87	4,5	— 7,2	— 1,26
	1	0,11				
	2	0,06				
20. VII.	0	0,19	3,20	4,5	— 6,8	— 1,06
	1	0,07				
	2	0,04				
6. IX.	0	0,50	6,1	4,5	— 14,9	— 1,23
	1	0,29				
	2	0,17				

Unsere Versuche beweisen zunächst, daß das Ammoniak aus dem Blute verschwindet. Es sind drei Möglichkeiten vorhanden, durch die dieser Vorgang erklärt werden kann.

1. Das Blut reagiert alkalisch. Dadurch, daß bei der Versuchsanordnung ständig Sauerstoff durch das Blut hindurchgeleitet wird, könnten unter Umständen größere Mengen von Ammoniak in Gasform durch den Sauerstoff mitgerissen werden und so das Verschwinden des Ammoniaks seine Erklärung finden.

2. In der durchströmten Muskulatur ist sicherlich mit größter Wahrscheinlichkeit die Ammoniakspannung eine geringere als im Blute, in dem erst nach dem Defibrinieren die großen darin enthaltenen Ammoniakmengen entstanden sind. Beim Durchströmen mit diesem ammoniakhaltigen Blute würden einfach große Mengen Ammoniak physikalisch in der Muskulatur absorbiert.

3. Es könnten die verschwundenen Ammoniakmengen im Stoffwechsel der Extremität in andere Substanzen, z. B. in Harnstoff, verwandelt werden.

Um zwischen diesen drei Möglichkeiten zu entscheiden, haben wir zunächst untersucht, ob und wieviel Ammoniak mit dem Sauerstoffstrom aus dem Blute abgedunstet wird. Wir haben zu diesem Zwecke den abströmenden Sauerstoff durch eine mit verdünnter, etwa n/20 Schwefelsäure beschickter Waschflasche in langsamem Strom durchgeleitet und die auf diese Weise aufgefangenen Ammoniakmengen in üblicher Weise durch Nesslerisation kolorimetrisch bestimmt. Das Resultat dieser Versuche gibt Tabelle IV wieder. Aus ihnen folgt, daß nur eine ganz minimale Menge Ammoniak mit dem Sauerstoff mitgerissen wird und so diese Fehlerquelle daher auszuschließen ist.

Tabelle IV.

$NH_3 = N$-Gehalt der Sauerstoffabgase.

Datum 1926	Dauer der Durchblutung Stunden	$NH_3=N$ mg-Proz.	Gesamtabnahme an NH_3-N	Abgase $= NH_3=N$
22. VI.	0	0,22	— 7,65	0,0005
	1	0,10		
	2	$0{,}05_6$		
23. VI.	0	0,48	— 12,60	0,0010
	1	0,24		
	2	0,20		

Schwieriger zu diskutieren ist die Frage, ob das Ammoniak durch physikalische Absorption in der Extremität verschwindet. Wenn man eine solche Annahme macht, muß man jedenfalls die Hilfshypothese dazunehmen, daß der Absorptionskoeffizient der Extremität, in erster Linie also der Muskulatur, für Ammoniak außerordentlich hoch ist, weil es sonst nicht vorkommen könnte, daß in einigen Versuchen etwa 80 Proz. des vorhandenen Ammoniaks verschwunden wäre. Wir haben zunächst versucht, durch folgende Überlegungen bestimmte Hinweise in diesem Punkte zu erhalten.

Wenn das Ammoniak physikalisch absorbiert würde, müßte es namentlich während der ersten paar Kreisläufe aus dem Blute verschwinden. Der ganze Vorgang müßte also in 20 Minuten im wesentlichen abgelaufen sein. Wir haben daher zunächst das Ausgangsblut untersucht, dann nach 20 bis 30 Minuten eine zweite Probe Blut aus der Vene entnommen und schließlich nach etwa einer Stunde eine dritte Blutprobe gemacht. Die Resultate einiger solcher Versuche zeigt die folgende Tabelle V. Aus ihr geht hervor, daß gerade im Anfang verhältnismäßig wenig Ammoniak aus dem Blute verschwindet und erst in der zweiten halben Stunde des Versuchs ein stärkeres Verschwinden des Ammoniaks zu beobachten ist. Jedenfalls sprechen diese Versuche

Tabelle V.

Verschwinden des Ammoniaks in der ersten Stunde.

Datum	Zeit	NH_3—N mg-Proz.	Extremität kg	Blutvolumen Liter	Gesamtabnahme	mg/kg/Stdn.
20. VII.	1h24′	0,19	3,20	4,5		
	1 46	0,15			— 18	— 0,32
	2 20	0,08			— 36	— 1,13
21. VII.	11 00	0,34	7,57	4,5		
	11 37	0,26			— 3,6	— 0,27
	12 00	0,09			— 11,3	— 1,45

nicht für eine physikalische Absorption, wenngleich man sie als unbedingt beweisend nicht ansehen kann.

Eine weitere Versuchsreihe stellten wir mit Cyanidzusatz (m/200) an. Blausäure unterdrückt ja bekanntlich alle Oxydationsvorgänge im Körper. Wenn auch die Umwandlung von Ammoniumcarbonat in Harnstoff keine Oxydation, sondern eine Umlagerung unter Wasserabgabe ist, so wird doch zweifellos ein solcher Prozeß nicht „von selbst“ vor sich gehen, sondern irgendwelche andere energieverbrauchende Prozesse zu seinem Zustandekommen benötigen. Diese Prozesse würden jedenfalls mit Sauerstoffverbrauch einhergehen. Wenn andererseits Ammoniak durch Absorption aus dem Blute verschwinden würde, so ist nicht anzunehmen, daß die geringe Menge Blausäure, die wir dem Blute zusetzen, eine wesentliche Veränderung der Absorptionskoeffizienten der in Betracht kommenden Gewebe verursachen würde, und wir würden jedenfalls an der mit Blausäure vergifteten Extremität ein Verschwinden des Ammoniaks von gleicher Größenordnung erwarten müssen, wie an der normalen. Versuche mit Blausäure könnten also zwei Resultate ergeben: Entweder ein Sinken des Ammoniaks wie im normalen Präparat, ein solches Resultat würde für unsere Fragestellung eine Entscheidung nicht bringen können. Denn es könnte entweder sein, daß Ammoniak physikalisch absorbiert würde, oder daß Ammoniak durch einen chemischen Prozeß verändert würde, der durch Blausäure nicht gehemmt wird. Derartige Prozesse kennen wir sehr wohl (wir erinnern nur an die Umwandlung von Zucker in Milchsäure). *Oder* aber wir würden in den Blausäureversuchen finden, daß der Ammoniakgehalt des Blutes konstant bleibt; dann wäre damit bewiesen, daß das Verschwinden des Ammoniaks normalerweise nicht physikalisch, sondern chemisch zu erklären ist. Zu diesem Zwecke vorgenommene Versuche (Tabelle VI) ergaben, daß im wesentlichen der Ammoniakgehalt nach Zusatz von Natriumcyanid unverändert blieb. Der Prozeß der chemischen Umwandlung des Ammoniaks in der Extremität läßt sich also durch Blausäure hemmen.

Tabelle VI.
Extremität + Blausäure.

Datum 1926	Dauer der Durchblutung Stunden	NH_3=N mg-Proz.	Extremität kg	Blutvolumen Liter	Gesamtabnahme	mg/kg/Stdn.
28. VII.	0	0,46	4,68	4,5	— 9,0	— 0,96
	1	0,38				
	2	0,26				
4. VIII.	0	0,42	4,65	4,5	+ 0,9	+ 0,10
	1	0,44				
12. VIII.	0	0,42	4,75	4,5	+ 0,9	+ 0,10
	1	0,40				
	2	0,44				
25. VIII.	0	0,35	5,40	4,5	+ 3,2	+ 0,59
	1	0,38				
	2	0,42				

Es ist damit bewiesen, daß es sich bei dem Verschwinden des Ammoniaks aus dem Blute tatsächlich um eine chemische Leistung der durchbluteten Extremität handelt. Eine andere Frage ist die, in welchen Körper sich denn das Ammoniak verwandelt. Man wird zunächst aus Wahrscheinlichkeitsgründen annehmen können, daß das Ammoniak sich in Harnstoff umwandelt; doch müssen wir ausdrücklich bemerken, daß wir aus unseren Versuchen allein einen solchen Schluß zu ziehen nicht berechtigt sind.

Zusammenfassung.

1. An der überlebenden, künstlich durchbluteten Hundeextremität sinkt der Ammoniakgehalt des Blutes auf 10 bis 50 Proz. des Anfangswertes in 1 bis 2 Stunden.

2. Diese Erscheinung ist nicht durch Abdunsten des Ammoniaks beim Sättigen des Blutes mit Sauerstoff zu erklären.

3. An der mit Natriumcyanid vergifteten künstlich durchströmten Hundeextremität bleibt der Ammoniakgehalt des Blutes konstant. Das Verschwinden des Ammoniaks ist also auf einen chemischen Prozeß zurückzuführen, der durch Blausäure gehemmt wird.

Stoffwechseluntersuchungen an mit technischem Chloranil (t. Chl.) oder Chloranilnebenprodukten (Chl. N. Pr.) lebergeschädigten Kaninchen. II.

Von

H. Staub.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Basel.)

(Eingegangen am 23. September 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In einer ersten Mitteilung[1]) wurden chemische Untersuchungen publiziert, welche zeigten, daß im technischen Chloranil (t. Chl.) Höchst (Fabrikation 1922) ein Nebenprodukt vorhanden ist, das bei peroraler Applikation an Kaninchen als Lebergift wirkt. Die Leberschädigung ist bei Gaben von 2 bis 3 g t. Chl. oder 0,3 bis 0,5 g Chloranilnebenprodukt (Chl. N. P.) pro Kilogramm Tier innerhalb 7 bis 10 Tagen letal.

Es sind hier Versuche an zehn Kaninchen zusammengestellt mit Vergiftungsverlauf und fortlaufender Untersuchung von Harn- und zum Teil auch Blutbestandteilen. Ferner wurden Kohlehydratbelastungsproben ausgeführt unter Berücksichtigung der Blutzuckerwerte. In der Hauptsache sind hier Versuche mit t. Chl. verwertet; nur an drei Kaninchen wurde Chl. N. Pr. (vgl. erste Mitteilung) verwendet. Chl. N. Pr. und alle in der ersten Mitteilung beschriebenen wirksamen Fraktionen zeigten, wenn sie innerhalb 7 bis 10 Tagen zum Tode führten, das gleiche Krankheitsbild und den gleichen Sektionsbefund, wie die mit t. Chl. vergifteten Tiere, nur fehlten natürlich bei den Tieren, die eine chloranilfreie Fraktion bekamen, die Symptome, welche allein auf Chloranilwirkung zu beziehen sind, wie Durchfall und Urinveränderungen durch vermehrte Ausscheidung gepaarter Phenolkörper. Wenn sich Tiere von schwerer Vergiftung wieder erholen, so findet man nach einigen Wochen eine typische atrophische Lebercirrhose mit vergrößerter Milz; über diese chronisch verlaufenden Intoxikationen wird später berichtet. Die ausführlichen pathologisch-anatomischen Befunde werden an anderem Orte mitgeteilt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 178 167. 1926

Methodische Bemerkungen zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Glucuronsäure und Phenolkörpern im Urin.

Die Naphthoresorcinprobe wurde in der Weise angestellt, wie sie von *C. Tollens*[1]) beschrieben ist. Als positiv wurde die Reaktion betrachtet, wenn die Ätherschicht deutlich violett oder blauviolett und der Absorptionsstreifen im Spektrum im Gelbgrün rechts von der *D*-Linie deutlich sichtbar war.

Die qualitative Hydrochinonprobe nach Desesquelle. Die Probe wurde nach der Originalarbeit so ausgeführt, daß man etwa 20 bis 30 ccm Urin mit 2 ccm Chloroform sehr sorgfältig durch 10- bis 20maliges Umstürzen ausschüttelte, zum Chloroformauszug ein Stückchen Stangenkali zugab und erwärmte. Die goldgelben Flecken auf den Kalilaugenstückchen, die für Anwesenheit von Hydrochinon sprechen, traten jedoch mit dem Urinauszug nicht ein; auch dann nicht, wenn zum Urin vorher kleine Mengen reinen Hydrochinons zugesetzt worden waren. Kontrollversuche mit verschiedenen reinen Phenolkörpern ergaben die typischen Flecken auf dem Kaliumhydroxydstückchen, wie sie *Desesquelle*[2]) beschreibt. Gemische der verschiedenen Phenole, wie sie auch im Urin vorkommen, scheinen aber eine deutliche Farbenreaktion zu verhindern und die Reaktion z. B. für den Hydrochinonnachweis im Urin ungeeignet zu machen.

Die quantitative Bestimmung der Sulfat- und Ätherschwefelsäuren nach E. Baumann[3]) ist dahin abgeändert, daß beide Niederschläge in Anlehnung an das *Folin*sche[4]) Verfahren durch Porzellan-Goochtiegel mit Asbestlagen abfiltriert, im Goochtiegel geglüht und gewogen wurden.

Quantitative Bestimmung der freien und Gesamtphenole nach Folin-Denis[5]). Die Methode ist kolorimetrisch mit Phosphorwolfram-Phosphormolybdänsäure als Reagens. Das gleiche Reagens ist von den beiden Autoren zur Harnsäurebestimmung angegeben, für die Phenolbestimmung aber so weit abgeändert worden, daß es auch mit Monooxybenzolen reagiert. Dieses Phenolreagens gibt mit allen Oxybenzolen in alkalischer Lösung eine blaue Farbe. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, daß der reagierende Körper in diesem Reagens durch die Phenole in saurer Lösung reduziert wird und nachher beim Zufügen von Alkali ein blaues Salz gibt. Zur quantitativen Bestimmung wird mit einer Standard-Phenollösung im Dubosq-Kolorimeter verglichen. Da in unseren Versuchen nach Chloranilgaben Dioxybenzole vielleicht vermehrt im Urin auftreten könnten, wurden Kontrollbestimmungen mit reinen Polyoxybenzolen ausgeführt.

Nach *Schulz*[6]) soll Chloranil im Organismus reduziert und als gepaartes Tetrachlorhydrochinon ausgeschieden werden. Es war zu untersuchen, ob die Voraussetzungen vorhanden sind, mit der *Folin-Denis*schen Methode auch Tetrachlorhydrochinon zu bestimmen. Tetrachlorhydrochinon ist vollkommen wasserunlöslich. Wenn wir den wohl wasserlöslichen Paarling zur Bestimmung der Gesamtphenole mit Mineralsäure spalten, muß Tetrachlorhydrochinon ausfallen. Tetrachlorhydrochinon löst sich dann aber

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 115, 1908.
[2]) C. r. de la Soc. Biol. **42**, 101, 1890.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 70, 1877/78.
[4]) Journ. of biol. Chem. **1**, 131, 1906.
[5]) Ebendaselbst **12**, 239, 1912; **22**, 305 und 309, 1915.
[6]) Untersuchungen über die Wirkung des Chinons und einiger Chinonderivate. Inaug.-Diss. Rostock 1892.

wieder nach Zusatz gesättigter Sodalösung in alkalischer Flüssigkeit und gibt mit Phosphorwolfram-Molybdänreagens eine blauviolette Färbung ähnlich den übrigen Phenolkörpern. Eine Bestimmung mit der *Folin-Denis*schen Methode ist danach möglich.

Die quantitativen Verhältnisse gehen aus Tabelle I hervor.

Tabelle I.

Präparat		Dubosq-Skalenteile mm
Standard-Phenollösung	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	20
p-Kresol	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	20,2
o- „	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	19,7
Brenzkatechin „resublim." *Merck*	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	12,1
„ , älteres Präp.	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	12,8
Resorcin „puriss. resubl. medicin." *Merck*	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	16,2
Resorcin*) resubl., älteres Präp.	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	16,0
Hydrochinon „puriss."	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	20,3
„ , älteres Präp.	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	22,0
Pyrogallol	0,5 mg in 100 ccm n/100 H Cl	15,0
Tetrachlorhydrochinon	5,0 mg in 100 ccm n/10 Na_2CO_3	11,0

*) Maßanalytische Bestimmung des Resorcingehaltes einer Lösung von diesem Präparat nach der Methode von *Koppeschaar* und *Degener* (Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abtlg. I, Tl. 4, H. 2, S. 322) ergab statt 0,050 0,049 g.

Kresole und Hydrochinon geben in gleichen Mengen die gleiche Farbenintensität wie die Standardlösung. Brenzcatechin, Resorcin und Pyrogallol geben dagegen stärkere Farbentiefe als gleiche Mengen Phenol und mehr gegen rot zu spielenden Farbenton. Bei Anwesenheit von z. B. Brenzcatechin in der zu untersuchenden Flüssigkeit wird demnach die Methode zu hohe Werte liefern. *Tetrachlorhydrochinon* gibt dagegen einen rund fünfmal niedrigeren Kolorimeterwert als die gleiche Menge Phenol. Ist, wie in unseren Versuchen, die nach *Folin-Denis* bestimmte erhöhte Phenolkörperausscheidung auf Tetrachlorhydrochinon zurückzuführen, so werden in der Tat etwa fünfmal größere Mengen an diesem Körper ausgeschieden als die Kolorimeterwerte, mit Phenol als Vergleichsflüssigkeit, angegeben.

Versuch 1 mit t. Chl.

Ein gut genährtes Kaninchen erhält am 28. Oktober 1922 2,5 g t. Chl. pro Kilogramm Körpergewicht, im ganzen 6,75 g in etwa 100 ccm Wasser aufgeschwemmt, mit der Schlundsonde. Während etwa 24 Stunden nach der Eingabe macht das Kaninchen einen kranken Eindruck, sitzt meist ruhig im Käfig, frißt nicht und hat Durchfall. Die folgenden Tage erholt es sich allmählich, wird beweglicher und fängt wieder an zu fressen. Vom 31. Oktober ab ist am Tier nichts Auffälliges zu bemerken, es verhält sich wie ein normales. Am 4. November bekommt das Tier plötzlich, scheinbar mitten aus bester Gesundheit heraus, klonisch-tonische Krämpfe am ganzen Körper, schreit mehrmals auf und geht innerhalb von 2 bis 3 Minuten ein. Das Tier war mit Heu, Brot, Runkelrüben und Krüsch gefüttert worden.

Aus der Tabelle II sind die Daten für Körpergewicht, Harnmenge, Harnfarbe, Albuminurie und Phenolreaktionen zu ersehen.

Tabelle II (Versuch 1).

Datum 1922	Körpergewicht g	Urinmenge ccm	Eiweiß im Urin Kochprobe	Urinfarbe	Phenolreaktionen			Bemerkungen
					Brom	Millon	$FeCl_3$	
27./28. X.	2700	200	0	braun	—	—	—	—
28. X. 6,75 g techn. Chloranil.								
28./29. X.	2350	205	0	grünbraun	0	+	0	Durchfall
29./30. X.	—	80	0	olivgrün	Spur	+++	0	frißt fast nichts
30./31. X.	2400	100	0	grünschwarz	0	++	0	frißt wenig
31.X./1.XI.	—	220	0	hellbraun	0	Spur	0	—
1./2. XI.	2350	260	0	"	—	+	—	—
2./3. XI.	—	138	Spur	dunkelbraun	—	Spur	—	—
3./4. XI.	2350	84	"	"	—	0	—	—
4./5. XI.	—	25	opal	hellbraun	—	0	—	Tod nach 8 Tg.

Vom 28. bis 31. Oktober wird grünlicher „Carbolharn“ entleert. Im vereinigten Urin vom 29., 30. und 30./31. Oktober gelingt der Nachweis von Hydrochinon nach *O. Schmiedeberg*[1]) nicht. Der Nachweis von gepaartem Tetrachlorhydrochinon wurde vorderhand nicht versucht. Für die Anwesenheit von Chinonkörpern im Urin spricht die Methhämoglobinbildung bei Zusatz von Harn zu frischem Blut.

Leucin und Tyrosin ließen sich in keiner Urinportion nachweisen.

Versuch 5 mit t. Chl.

Ein 2300 g schweres Kaninchen erhält am 17. November 1922 10 Uhr vormittags 6,9 g t. Chl. (3 g pro Kilogramm Körpergewicht) in 100 ccm H_2O aufgeschwemmt mit der Schlundsonde. Während der zwei folgenden Tage frißt es kaum und bewegt sich wenig. Nachher zeigt es normales Verhalten. Am 24. November fällt das Tier plötzlich auf die Seite, zeigt einige Sekunden klonisch-tonische Zuckungen der Extremitäten, schreit einige Male auf und geht 3 Uhr nachmittags ein. Der Exitus erfolgte am achten Tage nach der Vergiftung. Futter wie im Versuch 1. Blutbild: Hämoglobingehalt und Zahl der weißen und roten Blutkörperchen änderten sich im Verlauf der Vergiftung nicht.

Tabelle III zeigt Körpergewicht, Urinmenge, Urinfarbe, qualitative Glucuronsäure- und Hydrochinonprobe; quantitativ sind schwefelsaure Salze und Ätherschwefelsäuren und freie und Gesamtphenole fortlaufend bestimmt.

Die Urine vom 14. bis 17. November vor der Giftzufuhr wurden zusammengeschüttet, ebenso die Urine vom 18. bis 24. November nach t. Chl.-Eingabe, und die beiden Portionen nach Ansäuerung mit H_2SO_4 destilliert. In den Destillaten gaben die qualitativen Phenolproben folgendes Resultat.

	Millon	Bromwasser	$FeCl_3$
Destillat des Urins vor Giftzufuhr . . .	Spur	0	0
" " " nach " . . .	+++	++	0

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 14, 305, 1881.

Tabelle III. Versuch Nr. 5 mit t. Chl.

Datum	Körpergewicht	Urinfarbe	Urinmenge	Chloranil im Stuhl	Naphthoresorcinprobe	Phenole: absolute Werte		Phenole: Proz.-Werte		Schwefelsäure: absolute Werte		Schwefelsäure: Proz. d. ges. H_2SO_4		Bemerkungen
						freie	total	freie	gebundene	Sulfate	Äther H_2SO_4	Sulfate	Äther H_2SO_4	
1922	g		ccm			g	g			g	g			
15./16. XI.	2300	dunkelbraun	120	—	θ	0,085	0,100	85	15	0,192	0,036	84	16	
16./17. XI.	—	„	90	θ	θ	0,075	0,090	83	17	0,218	0,025	90	10	
17. XI. 11 Uhr 6,9 g t. Chl. mit Schlundsonde.														
17./18. XI.	—	hellbraun	154	++	θ	0,045	0,060	74	26	0,053	0,008	87	13	nichts gefressen
18./19. XI.	2100	dunkelgrün	90	++	++	0,076	0,178	43	57	0,015	0,061	20	80	frißt wenig
19./20. XI.	2100	dunkelbraun	55	+	+	0,042	0,050	82	18	0,077	0,016	83	17	„ normal
20./21. XI.	2100	„	92	θ	θ	0,108	0,114	95	5	0,094	0,082	53	47	„ „
21./22. XI.	—	„	150	θ	θ	0,124	0,157	79	21	0,255	0,090	74	26	„ „
22./23. XI.	2100	„	65	θ	θ	0,089	0,102	87	13	0,057	0,047	55	45	„ „
23./24. XI.	—	„	40	θ	θ	—	—	—	—	0,103	0,044	—	—	Tod 24. XI.

Kochproben auf Eiweiß und Hydrochinonprobe während des ganzen Versuches stets negativ.

Im Destillat des Urins nach Chloranilgabe wurden nach der Methode von *M. Siegfried* und *R. Zimmermann*[1])

0,00279 g p-Kreosol
und 0,00303 g Phenol
= 0,00582 g Gesamtphenol im Destillat

aus 100 ccm Urin bestimmt. Die *Folin-Denis*-Methode ergab die Zahl 0,0046 g. Danach sind nur etwa $^1/_{20}$ der Gesamtphenole, welche im nativen Urin nach *Folin-Denis*scher Methode gefunden wurden, als flüchtige Phenolkörper vorhanden.

Versuch 8 mit t. Chl.

Ein 3 kg schweres Kaninchen erhält am 18. Dezember 1922 9 g t. Chl. mit der Schlundsonde. Die beiden auf die Eingabe folgenden Tage hat das Tier etwas Durchfall und frißt wenig; nachher verhält sich das Kaninchen wie ein gesundes. Am 26. Dezember 1922 schreit es kurz vor Exitus einige Male auf, fällt auf die Seite, zuckt 2 bis 3 Minuten mit den Extremitäten und geht rasch ein. Der Exitus erfolgte am neunten Tage nach der Giftzufuhr. Körpergewicht und Harn wurden wie in den vorhergehenden Versuchen 1 und 5 untersucht, außerdem wurden quantitativ Phenole nach *Folin-Denis*, die Sulfate und Ätherschwefelsäuren nach modifizierter *Baumann*scher Methode und die Chloride im Harn nach *Volhard-Arnold* gestimmt. Die Versuchsresultate sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Blut, gleich nach Exitus entnommen, enthält 98 mg Harnstoff in 100 ccm Blut. Kein Methämoglobin. Bilirubinreaktion im Serum nach *Hymans v. d. Berg* direkt und indirekt negativ. Die Chlorausscheidung steigt, wie aus Tabelle IV hervorgeht, nicht an, die kerngebundenen Chloratome im Chloranil werden demnach, wie zu erwarten war, im Organismus nicht abgespalten und kommen nicht als Chlorionen zur Wirkung.

Versuch 13 mit t. Chl.

Ein 2525 g schweres Kaninchen wird am 9. Februar 1923 mit 7,575 g t. Chl. vergiftet. Das Tier frißt 2 bis 3 Tage nach der Vergiftung wenig, und entsprechend der Nahrungszufuhr ist auch die Diurese gering. Die folgenden Tage nimmt die Freßlust wieder etwas zu, doch erreicht sie nicht die Höhe, wie vor der Vergiftung. Vom 13. Februar ab ist eine zunehmende Vergrößerung der Leber zu palpieren. Am Morgen des 16. Februar wird das Tier tot im Käfig vorgefunden. Die Vergiftungsdauer betrug 8½ Tage. Futter: Runkelrüben, Brot und Heu.

Im Urin wurde das Reduktionsvermögen fortlaufend bestimmt. Durch alimentäre Blutzuckerkurven nach *Traubenzuckergaben* vor und während der Vergiftung wurde untersucht, ob die Leberschädigung sich irgendwie im Verlauf der Glykämiekurve manifestiert. Das Tier blieb vor der Aufnahme der alimentären Glykämiekurve jeweilen über Nacht ohne Futter. Morgens erhielt es jeweilen 2 g Traubenzucker pro Kilogramm Körpergewicht in 10proz. Lösung mit der Schlundsonde (der Blutzucker ist nach *Bang*-

[1]) Diese Zeitschr. 29, 368, 1910.

Tabelle IV. Versuch Nr. 8 mit t. Chl.

Datum	Körpergewicht	Urinmenge	Chloranil im Stuhl	Na Cl im Urin	Phenole				Schwefelsäure				Bemerkungen
					freie	Gesamt-Phenole	Proz. der Gesamtphenole		als Salze	als Äther H_2SO_4	Proz. der H_2SO_4		
							an freien	an gebundenen			an Salzen	an Äther H_2SO_4	
1922	g	ccm		g	g	g			g	g			
16./17. XII.	2850	140	θ	2,04	0,087	0,116	75	25	0,202	0,034	86	14	
17./18. XII.	3000	220	θ	3,46	0,134	0,181	74	26	0,200	0,080	75	25	
9 g t. Chl. mit Schlundsonde.													
18./19. XII.	2900	230	++	0,37	0,087	0,179	48	52	—	0,139	—	—	frißt nicht; starker Durchfall
19./20. XII.	—	115	+	0,14	0,144	0,261	55	45	0,040	0,143	22	78	frißt sehr wenig; geringer Durchfall
20./21. XII.	2750	70	+	0,87	0,087	0,133	65	35	0,001	0,007	13	87	frißt wenig
21./22. XII.	—	65	Spur	1,44	0,049	0,081	60	40	0,000	0,003	0	100	„ mehr
22./23. XII.	2800	110	θ	1,22	0,078	0,152	51	49	0,052	0,056	48	52	„ gut
23./24. XII.	—	64	θ	0,48	0,053	0,084	63	37	0,062	0,035	64	36	„ „
24./25. XII.	2550	67	θ	0,56	0,048	0,078	62	38	0,007	0,035	17	83	„ wenig
25./26. XII.	—	58	θ	0,07	0,080	0,096	83	17	0,013	0,023	36	64	26. XII. 9h 45' Tod

Tabelle V. Versuch Nr. 13 mit t. Chl.

Datum	Körpergewicht	Urinmenge	Urin verd. auf	Spez. Gew. des verd. Urins	Reduktionsproben im verd. Urin				Reduktionsgröße im verd. Urin		Polarisationswerte im verd. Urin		Bemerkungen
					nach *Fehling*		nach *Nylander*		nach *Bang* in Proz. Zucker		in Proz. Traubenzucker im gekl. Urin		
					nativ. Urin	Urin mit Bleizucker geklärt	nativ. Urin	Urin mit Bleizucker geklärt	im nativ. Urin	im geklärten Urin	vor Gärung	nach Gärung	
1923	g	ccm	ccm										
7./8. II.	2575	400	—	1020	0	0	0	0	—	—	—0,02	—0,04	8. II. 2 g Glucose pro kg K.-G.
8./9. II.	2525	254	—	—	—	0	—	0	0,041	0,022	—0,01	—0,02	
9. II. 7,575 g t. Chl.													
9./10. II.	—	110	200	—	0	Spur	0	0	0,033	—	—0,02	—0,08	
10./11. II.	—	130	200	—	+++	++	+++	++	*0,225*	—	—*0,71*	—0,31	
11./12. II.	2425	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
12./13. II.	—	300	—	1021	++	+	++	+	*0,175*	*0,100*	—*0,27*	—*0,08*	12. II. 2 g Glucose pro kg K.-G.
13./14. II.	2350	150	250	1017	—	0	—	0	—	0,032	± 0,00	—0,02	
14./15. II.	2225	210	250	1005	+	0	0	0	0,028	0,014	± 0,0	—0,05	14. II. 2 g Glucose pro kg K.-G.
15./16. II.	—	35	150	1008	—	Spur	—	0	—	0,066	—0,09	—0,14	

scher Mikromethode im Blute aus der Ohrvene bestimmt). Tabelle V und Abb. 1 enthalten die Resultate.

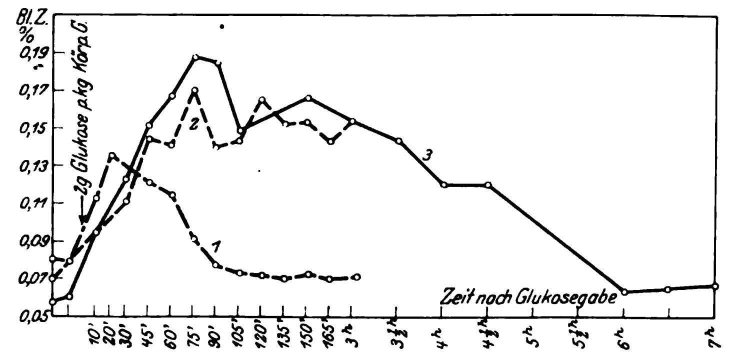


Abb. 1. 1 = alimentäre Blutzuckerkurve vor Leberschädigung. 2 = alimentäre Blutzuckerkurve 3 Tage nach Giftzufuhr. 3 = alimentäre Blutzuckerkurve 5 Tage nach Giftzufuhr.

Versuch 14 mit t. Chl.

Der Versuch dient wie der vorhergehende zur Bestimmung der Reduktionsgrößen und des Drehungsvermögens des Urins. Außerdem wird an der geschädigten Leber das Verhalten der glykämischen Kurve nach *Lävulose*zufuhr untersucht (Abb. 2). Im Gesamtblut ist während der Vergiftungsdauer der Harnstoff nach der Ureasemethode bestimmt. (Die verwendete Urease ist amerikanischer Herkunft, bezogen von the Arlington Chemical Co., Yonkers, New York.) Die *Seliwanoff*sche Probe ist nach Modifikation *R.* und *O. Adler*[1]) ausgeführt.

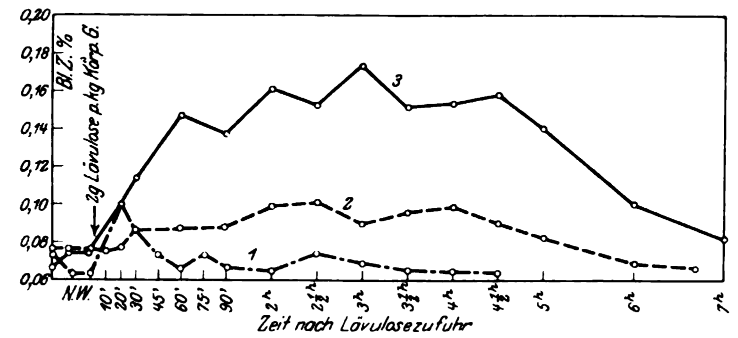


Abb. 2. 1. = 23. Februar 1923 vor Leberschädigung. 2. = 26. Februar 1923 2 Tage nach Vergiftung. 3. = 28. Februar 1923 4 Tage nach Vergiftung.

Ein 3000 g schweres Kaninchen erhält am 24. Februar 1923 9 g t. Chl. in H_2O aufgeschwemmt mit der Schlundsonde in den Magen. Während zweier Tage besteht Durchfall. Vom 24. bis 27. Februar frißt das Tier wenig. Am 28. Februar frißt es wieder gut und macht einen normalen Eindruck. Am 1. März geht es nach einigen Minuten dauernden Krämpfen und Schreien plötzlich ein. Vergiftungsdauer 6 Tage.

Die Tabelle VI gibt Zahlen.

[1]) Pflügers Arch. **106**, 323, 1905.

Tabelle VI. Versuch Nr. 14 mit t. Chl.

Datum	Körpergewicht	Urinmenge	Urin verd. auf	Spez. Gew. des verd. Urins	Reduktionsproben im verd. Urin				Reduktionsgröße im verd. Urin		Polarisationswerte im verd. Urin		*Seliwanoff*	Harnstoff in 100 ccm Blut	Bemerkungen
					nach *Fehling*		nach *Nylander*		nach *Bang* in Proz. Zucker		in Proz. Zucker	im gekl. Urin			
					nativ. Urin	Urin mit Bleizucker geklärt	nativ. Urin	Urin mit Bleizucker geklärt	im nativ. Urin	im geklärten Urin	vor Gärung	nach Gärung			
1923	g	ccm	ccm											mg	
20./21. II.	—	270	—	1015	Spur	0	0	—	0,042	0,027	—	—	0	—	
21./22. II.	3050	250	—	1014	+	0	0	—	0,046	0,027	+ 0,04	— 0,03	0	—	
22./23. II.	—	260	—	1021	+	0	0	—	0,102	0,082	— 0,03	— 0,14	0	—	23. II. 2 g Lävulose pro kg
23./24. II.	3000	190	250	1017	+	0	+	—	0,070	0,057	— 0,04	— 0,07	0	—	
24. II. 9 g t. Chl.															
24./25. II.	—	120	250	1020	+++	+	++	—	0,127	0,065	— 0,10	— 0,10	0	—	
25./26. II.	2500	40	250	1010	++	+	++	—	0,060	0,036	— 0,11	— 0,13	0	74	26. II. 2 g Lävulose pro kg
26./27. II.	—	100	250	1018	+++	+++	++	+	0,135	*0,135*	— 0,84	— 0,32	+	—	
27./28. II.	2525	70	250	1011	++	++	+	(+)	0,052	0,050	— 0,14	— 0,16	(+)	81	28. II. 2 g Lävulose pro kg
28. II./1. III.	2475	120	250	1012	+	+	+	(+)	0,132	0,100	— 0,11?	— 0,16	++	111*)	1. III. Exitus

*) Gesamt-N in 100 ccm Blut = 1 757 g. Rest-N in 100 ccm Blut = 0,138 g.

Versuch 9 mit t. Chl.

Dieser Versuch wurde angesetzt, um an der geschädigten Leber Funktionsprüfungen mit Hilfe der alimentären Blutzuckerkurve anzustellen. Bei Eingabe von Traubenzuckerlösung, zweimal 24 Stunden nach Chloranilgabe, wurde die Lösung jedoch statt in den Magen in die Trachea eingeführt, so daß das Tier akut zugrunde ging. Der Versuch wird trotzdem angeführt, weil einerseits ein frühes Stadium der Leberveränderungen vorliegt, und andererseits Blutzuckerkurven am gesunden Tiere bestimmt wurden, die zum Vergleich mit den gut gelungenen Versuchen 13 und 14 wichtig sind.

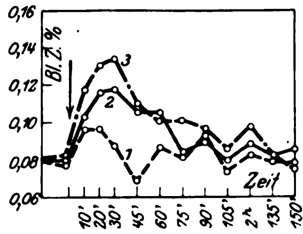


Abb. 3.
1. nach Schlundsondeneinführung.
2. nach 1 g Glucose intrastomachal.
3. nach 5 g Glucose intrastomachal.

Das Tier war vom 16. Januar 1923 ab im Käfig und wurde mit Heu, Brot und Runkelrüben gefüttert. Am 17. Januar wurde der Blutzucker nach Einführung der Schlundsonde ohne Zufuhr von Zucker während 2½ Stunden verfolgt, um den Einfluß der Erregung und motorischen Unruhe auf den Blutzucker zu bestimmen. Am 19. Januar wurde eine Blutzuckerkurve nach 1 g Traubenzucker und am 20. Januar nach 5 g Traubenzucker in 10proz. Lösung nach intrastomachaler Applikation bestimmt (vgl. Abb. 3). Am 21. Januar bekam das Kaninchen 9 g t. Chl. in den Magen und ging infolge Versuchsfehler zweimal 24 Stunden später ein. Gewichtsverlust während der Vergiftungsdauer 500 g (3000—2500 g).

Versuch 15 mit t. Chl.

Ein Kaninchen von 1850 g Körpergewicht erhält am 8. März 1923 12 Uhr 15 Minuten 5,5 g t. Chl. intrastomachal. Die folgenden 2 Tage hat es Durchfall, ist bewegungsarm, frißt nicht und nimmt an Gewicht ab. Am dritten Tage nach Giftzufuhr fängt das Tier wieder an zu fressen und wird allmählich lebhafter. Vom 3. März an zeigt es völlig normales Verhalten, frißt das gesamte Futter, bestehend aus 250 g Rüben und 50 g Brot und nimmt an Gewicht zu. Die Urinmengen sind normal.

Am 20. März 12 Uhr 30 Minuten, 12 Tage nach der ersten Giftdosis, erhält das Tier, das einen gesunden Eindruck macht, wiederum 5,33 g t. Chl. in den Magen. Sofort tritt wieder starker Durchfall auf, und 30 Stunden nach der zweiten Giftdosis geht das Kaninchen unter kurzdauernden terminalen Krämpfen ein.

Im Urin sind Drehungsvermögen, Harnstoff- und Gesamt-α-Aminosäuren-N[1]) und im Blute Harnstoff fortlaufend bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle VII zusammengestellt.

Versuch 15 fällt deshalb etwas aus der Reihe, weil bei gleicher Dosierung von 3 g t. Chl. pro Kilogramm Körpergewicht, im ganzen allerdings nur 5,5 g, die Intoxikation nicht letal endete. Erst eine zweite, gleiche Dosis des

[1]) Der α-Aminosäuren-N ist nach *van Slyke*scher Methode mit Mikroapparat bestimmt (vgl. Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abtl. I, Tl. 7, H. 2, S. 263, 1922.

Tabelle VII (Versuch 15).

Datum 1923	Körpergewicht g	Urinmenge ccm	Urin verd. auf ccm	Spez. Gew. des verd Urins	Harnstoff im Urin g	Gesamt-α-Amino-N im Urin absol. g	Harnstoff in 100 ccm Blut mg	Drehungsvermögen des Urins als Proz. Traubenzucker
6./7. III.	1900	112	300	1009	0,80	0,0183	27	—0,03
7./8. III.	1850	232	300	1017	2,04	0,0238	24	—0,02
8. III. 12h 15' 5,5 g t. Chl.								
8./9. III.	1750	90	300	1006	0,87	0,0234	*54*	—0,05
9./10. III.	1700	56	300	1010	*3,06*	0,0155	—	*0,11*
10./11. III.	1725	75	300	1011	*2,82*	0,0168	—	*0,14*
11./12. III.	1600	175	300	1013	*2,16*	*0,0319*	*60*	—0,04
12./13. III.	1700	200	300	1015	1,89	*0,0297*	22	—0,05
13./14. III.	1775	212	300	1015	1,50	0,0179	12	—0,01
14./15. III.	1770	258	300	1013	1,11	0,0235	—	—0,00
15./16. III.	1700	240	300	1013	1,29	0,0277	—	+ 0,01
16./17. III.	1800	220	330	1012	1,05	0,0210	21	—0,02
17./18. III.	1750	174	300	1009	1,23	0,0255	—	+ 0,02
18./19. III.	1775	272	300	1012	1,44	0,0321	36	+ 0,02
19./20. III.	1725	167	300	1010	1,41	0,0303	20	—0,04
20. III. 12h 30' 5,33 g t. Chl.								
20./21. III.	1575	160	300	—	0,69	*0,0705*	*169*	—

Giftes 12 Tage nach der ersten Vergiftung führte innerhalb 30 Stunden zum Tode. Es kommt anscheinend nicht nur auf die Menge Gift pro Kilogramm Körpergewicht, sondern auch auf die absolute Menge des einverleibten t. Chl. oder der toxischen Substanz an, damit eine letale Vergiftung auftritt. Kleineren Tieren, wie dem Versuchskaninchen Nr. 15, das nur 1850 g wog, müßte eine höhere Dosis als nur 3 g pro Kilogramm Körpergewicht beigebracht werden, um den Exitus, wie in den vorhergehenden Versuchen, nach 6 bis 8 Tagen zu erreichen.

Die quantitative, fortlaufende Bestimmung einiger N-Substanzen in Harn und Blut des Kaninchens Nr. 15 gibt Aufschluß über die Relationen zwischen diesen Körpern und der toxisch geschädigten Leber. Am ersten Tage nach Giftzufuhr steigt der Harnstoffgehalt im Blute, am zweiten Tage folgt eine vermehrte Harnstoffausscheidung im Urin, die bis zum vierten Tage anhält und trotz reduzierter Nahrungszufuhr die Ur⁺-Ausscheidung der Vorperioden erheblich übertrifft. Der Harnstoffgehalt im Blute konnte am zweiten und dritten Tage nach der Giftzufuhr nicht bestimmt werden, da das Tier infolge des schweren Wasserverlustes durch die Durchfälle schlecht blutete. Wahrscheinlich hätten wir an diesen beiden Tagen hohe Bluthamstoffwerte bekommen, denn noch am vierten Tage ist der Wert um mehr als das Doppelte der Norm erhöht (60 mg in 100 ccm Blut). Der Gesamt-α-Amino-N-Wert kann wohl unter Berücksichtigung des Nahrungsausfalls, mit 0,0234 g für den ersten Tag nach der Vergiftung als hoch bezeichnet werden. Besonders auffällig ist dieser Wert im Vergleich mit dem niederen Harnstoffgehalt des gleichen Urins. An den zwei folgenden Tagen kehrt sich das Verhältnis um; bei hohen Urinharnstoffwerten ist die α-Amino-

N-Ausscheidung sehr gering. Erst am vierten und fünften Tage nach der Giftzufuhr steigen die α-Amino-N-Werte hoch an. Nach der zweiten Vergiftung haben wir wieder ähnliche, nur weit deutlichere Verhältnisse wie nach der ersten Vergiftung. Der Bluthamstoff steigt hoch an, zugleich erreicht die α-Amino-N-Ausscheidung ihren Höchstwert, und die Harnstoffausscheidung ist ein Minimum.

In den folgenden drei Versuchen ist *Chloranil-Nebenprodukt* (Chl. N. Pr.) verwendet. Die Darstellung erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode durch Zerstörung des Chloranils mit warmer 5proz. NaOH (vgl. erste Mitteilung).

Versuch 26 mit Chl. N. Pr.

Ein 2150 g schweres Kaninchen erhielt am 9. Mai 1923 0,5 g Chl. N. Pr. in 50 ccm warmem Wasser aufgeschwemmt mit der Schlundsonde. Während der ganzen Dauer der Vergiftung fällt am Kaninchen nur auf, daß es weniger frißt als ein gesundes und geringe Urinmengen sezerniert. Sonst verhält es sich völlig normal. In der Nacht vom 15./16. Mai, d. h. am siebenten auf achten Tag nach der Vergiftung, geht es ein. Die folgende Tabelle gibt die Daten für Körpergewicht, Urinmenge, Urinfarbe, spezifisches Gewicht, Albuminurie. Chlor- und Harnstoffmenge des Urins.

Tabelle VIII. Versuch 26 mit Chl. N. Pr.

Datum 1923	Körpergewicht g	Urinmenge ccm	Urin verd. auf ccm	Spez. Gew. des verd. Urins	Harnfarbe	Albuminurie	Chlor absol. g	Ur+ *) absol. g
			9. V. 0,5 g Chl. N. Pr.					
9./10. V.	2150	70	250	1003	hellbraun	0	0,122	0,255
10./11. V.	—	130	250	1020	braun	0	0,787	2,265
11./12. V.	2000	90	250	1010	„	0	0,542	2,167
12./13. V.	—	40	150	1011	hellbraun	opal	1,157	1,102
13./14. V.	1950	30	150	1006	„	+	0,043	0,954
14./15. V.	—	40	150	1011	„	opal	0,395	1,299
15./16. V.	—	20	100	—	gelb	0	0,063	0,807

*) NH_3 mitgerechnet.

Versuch 33 mit Chl. N. Pr.

Ein Kaninchen von 3300 g erhält am 18. Mai 1923 0,3 g Chl. N. Pr. in Wasser aufgeschwemmt mit der Sonde in den Magen. Bis zum 20. Mai frißt es gut und ist lebhaft, die Urinmenge ist normal. Vom 20. Mai ab frißt es weniger, ein anderes krankhaftes Symptom ist am Tier nicht zu sehen. 24. Mai morgens ist es weniger lebhaft, fängt gegen Mittag an Schaukelbewegungen mit dem Kopf zu machen und wird gegen Abend in extremis durch Verbluten getötet. Vergiftungsdauer 6 Tage. Der Urin ist während der Intoxikation auf Albuminurie untersucht, ferner sind Harnstoff, NH_3, freie und Gesamt-α-Aminostickstoffausscheidung und r_H quantitativ verfolgt. Die Werte für Amino-N sind Durchschnittszahlen aus zwei bis drei Bestimmungen. r_H ist nach *Michaelis'* Indikatorenmethode mit Puffer bestimmt (vgl. Tabelle IX).

Tabelle IX. Versuch Nr. 33.

Datum 1923	Körpergewicht g	Urinmenge ccm	Urin verd. auf ccm	Spez. Gew. des verd. Urins	Urinfarbe	Albuminurie	P_H	Absolute Werte von −NH_3 g	Ur+ g	freier α-Amino-N. g	Gesamt-α-Amino-N. g	Ur+ in 100 ccm Blut mg
					18. V. 0,3 g Chl. N. Pr.							
18./19. V.	3300	150	250	1022	braun	0	7,7	0,0370	2,79	0,0505	0,0566	—
19./20. V.	—	180	250	1023	„	0	7,5	—	—	—	—	—
20./21. V.	3400	115	250	1022	„	0	7,6	0,0102	2,36	0,0367	0,0501	—
21./22. V.	—	275	275	1022	„	Spur	7,6	—	—	—	—	27
22./23. V.	3250	100	250	1010	„	0	7,5	0,0025	1,27	0,0256	0,0288	—
23./24. V.	2950	100	250	1014	„	opal	7,6	—	—	—	—	82

Verteilung der N-Stoffe auf 100 ccm Blut nach Exitus entnommen:
Gesamt-N 2,458 g, Rest-N 0,136 g, Ur+-N 0,060 g, Gesamt-α-Amino-N 0,065 g.

Tabelle X. Versuch Nr. 34.

Datum 1923	Körpergewicht g	Urinmenge ccm	Urin verd. auf ccm	Spez. Gew. des verd. Urins	Urinfarbe	Albuminurie	P_H	Absolute Werte von −NH_3 g	Ur+ g	freier α-Amino-N. g	Gesamt-α-Amino-N. g	Ur+ in 100 ccm Blut mg
					19. V. 0,3 g Chl. N. Pr.							
19./20. V.	1975	80	250	1013	braun	0	7,4	0,005	1,383	0,0298	0,0300	—
20./21. V.	—	60	250	1018	„	0	7,4	—	—	—	—	—
21./22. V.	—	50	250	1011	„	0	7,4	—	—	—	—	18
22./23. V.	2000	75	250	1012	„	0	7,0	0,051	1,25	0,0307	0,0392	—
23./24. V.	—	75	250	1020	„	0	7,6	0,025	1,462	0,0190	0,0305	36
24./25. V.	†	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Im Blut ist der Harnstoffgehalt verfolgt. Nach der Ohrvenenpunktion am 24. Mai gerinnt das Blut auffallend schlecht.

Versuch 34.

Einem Kaninchen von 1975 g werden am 19. Mai 1923 0,3 g Chl. N. Pr. mit der Sonde in den Magen gegeben. In der Nacht vom 24./25. geht es ein. Die Vergiftungsdauer betrug 6 Tage. Während dieser Zeit fraß das Tier etwas weniger als vorher und hatte geringere Urinmengen, sonst fiel nichts Abnormes auf. An Gewicht nahm es nicht ab. In Urin und Blut wurden die gleichen Untersuchungen vorgenommen, wie im vorhergehenden Versuch Nr. 33 (vgl. Tabelle X).

Durch die Versuche 26, 33 und 34 ist der einwandfreie Beweis geleistet, daß *im Chl. N. Pr. das wirksame Lebergift* enthalten ist. Die Leberveränderungen sind identisch mit denjenigen in den Versuchen mit technischem Chloranil. Die Versuche mit dieser Substanz sind infolge des Wegfalls der reinen Chloranilwirkungen viel übersichtlicher geworden. Wir haben jetzt nur Lebergiftwirkung; denn die übrigen Organe werden durch das Gift nicht oder in nicht nennenswertem Maße geschädigt. Speziell wichtig ist, daß die Nieren im histologischen Bild keine krankhaften Verhältnisse bieten. Der Vergiftungsverlauf weist nichts Typisches auf. Die Freßlust ist vielleicht etwas vermindert und entsprechend auch die Urinmenge geringer, sonst verhalten sich die vergifteten Tiere bis kurz vor Exitus wie normale.

Die quantitative Bestimmung der *N-Stoffe im Urin* (Versuch 33 und 34) ergibt für Versuch 33 am ersten Tage nach der Vergiftung absolut hohe Werte für NH_3, Harnstoff und α-Aminosäuren. Da keine Vorperiode untersucht ist, müssen Vergleichswerte für Ur^+ und α-Aminosäuren aus der Tabelle VII, Versuch 15 entnommen werden. Beim gesunden Tiere mit normaler Urinmenge von etwa 100 liegen die 24stündigen Harnstoffwerte zwischen 1 und 2 g, diejenigen des Gesamt-α-Amino-N zwischen 0,02 und 0,03. In Versuch 33 liegen demnach der Harnstoffwert mit 2,79 g und der Gesamt-α-Aminosäuren-N-Wert mit 0,056 für den ersten Tag nach der Vergiftung erheblich über der Norm. Die NH_3-Ausscheidung ist ebenfalls hoch. Gegen den Exitus zu nehmen alle diese Werte allmählich ab und erreichen am Tage vor Exitus normale Werte. In Versuch 34 sind die Zahlen für NH_3, Ur^+ und α-Aminosäuren am ersten Tage nach der Einverleibung des Giftes nicht über der Norm, dagegen stehen am vierten Vergiftungstag die NH_3- und α-Aminosäurenwerte über den Normalzahlen. Auch in Versuch 26 ist vermehrte Harnstoffausscheidung erst am zweiten und dritten Tage nach Giftgabe nachzuweisen. In Versuch 34 und 26 hat, wie in Versuch 15, die vermehrte Ausscheidung der N-Stoffe erst nach den ersten 24 Stunden eingesetzt, der Beginn des Anstiegs wurde bei Versuch 34 nicht gefaßt. Der Gesamt-α-Amino-N besteht zum größten Teil, manchmal fast ausschließlich, aus freiem α-Amino-N. Geringgradige Albuminurie (Kochprobe) wurde nur in Versuch 26 gefunden. Die Chloridausscheidung ist inkonstant, am zweiten und dritten Tage nach der Vergiftung mit 0,8 und 0,5 g wohl etwas erhöht (Versuch 26).

Im *Blute* ist der Harnstoffgehalt am Tage vor Exitus etwas erhöht (36 und 82 mg in 100 ccm Gesamtblut). Die Aufarbeitung des Blutes von Kaninchen 33, das in extremis durch Verbluten gewonnen wurde, ergibt hohen Gehalt an Rest-N und α-Amino-N.

Im Urin ist eine Verschiebung des p_H nicht eingetreten und im Blute deshalb auch nicht wahrscheinlich.

Übersicht der Versuchsresultate.

Sowohl *technisches Chloranil* in Dosen von 2 bis 3 g pro Kilogramm, wie *Chl. N. Pr.* in Mengen von 0,3 bis 0,5 g pro Kilogramm an Kaninchen intrastomachal gegeben, führen innerhalb 6 bis 8 Tagen zum Exitus. Bei allen letal verlaufenden Fällen besteht die Giftwirkung in einer typischen, stets gleichförmig wiederkehrenden Leberzerstörung.

Der *Vergiftungsverlauf* variiert je nachdem t. Chl. oder das chloranilfreie Chl. N. Pr. gegeben wird. Wird t. Chl. gegeben, so sind am Vergiftungsverlaufe drei Stadien zu unterscheiden, von denen das erste Stadium nur durch Symptome der reinen Chloranilwirkung beherrscht ist. Wird Chl. N. Pr. gegeben, so fehlt dieses erste Stadium und es sind nur zwei Stadien im Vergiftungsverlauf zu unterscheiden.

Im *ersten Stadium*, etwa in den ersten 48 bis 72 Stunden nach der Zufuhr von t. Chl., macht das Tier einen kranken Eindruck, frißt wenig oder nichts und nimmt an Gewicht ab. Gleichzeitig besteht starker *Durchfall*; im Stuhl wird reichlich Chloranil entleert. Der Urin ist typischer Carbolharn. Die Reduktionsproben mit Fehling und Nylander sind in diesem ersten Stadium der Vergiftung stark positiv; die Reduktionsgrößen, bestimmt nach *Bang*scher Methode, und die Linksdrehung sind maximal (vgl. Versuche 13 und 14). Die Naphthoresorcinprobe nach *C. Tollens* ist positiv (vgl. Versuch 5), was im Verein mit der starken Linksdrehung für vermehrte Ausscheidung gepaarter Glucuronsäure spricht. Von den qualitativen Phenolreaktionen ist die *Millon*sche und Bromwasser-Reaktion positiv (vgl. Versuch 1).

Die quantitativen Untersuchungen über Phenol- und Ätherschwefelsäureausscheidung zeigen in diesem ersten Stadium Anwachsen der Gesamtphenole und Ätherschwefelsäuren (vgl. Versuche 5 und 8). Diese Werte steigen bis etwa zum Doppelten der Norm der Vorperiode an und erreichen dieses Maximum am zweiten Tage nach der Vergiftung. Diese Zahlen sind um so höher zu bewerten, da in diesen Tagen die Tiere fast keine Nahrung zu sich nehmen und die alimentäre Phenolausscheidung deshalb in Wegfall kommt. *E. Baumann*[1]) hat als erster die Abhängigkeit der Phenolkörperausscheidung von der zugeführten Nahrung quantitativ verfolgt und kam zu dem Resultat, daß Rüben und Kartoffeln geringe, Heu stärkere alimentäre Phenolurie verursacht (unter Phenolurie verstehe ich die Gesamtausscheidung der verschiedenen Phenolderivate). In den Versuchen 5 und 8 wurde mit Heu, Brot und Runkelrüben gefüttert. Bei diesem Futter wurden gefunden: bei einem 2300 g schweren Kaninchen (Nr. 5) vor der Vergiftung 0,090 bis 0,102 g Totalphenole und 0,025 bis 0,036 g Ätherschwefelsäure; am zweiten Tage nach der Vergiftung 0,178 g Totalphenole und 0,061 g Ätherschwefelsäure; bei einem 3000 g schweren Kaninchen (Nr. 8) vor der Vergiftung 0,116 bis 0,181 g Totalphenole und 0,034 bis 0,080 g Ätherschwefelsäure; am zweiten Tage nach der Vergiftung 0,261 g Totalphenole und 0,143 g Ätherschwefelsäure.

In Versuch 8 erreicht auch die Ausscheidung der freien Phenole ein Maximum; während in Versuch 5 die freien Phenole gegenüber der Vorperiode nicht vermehrt sind. Die Sulfate werden in beiden Versuchen nach der Giftzufuhr in erheblich geringerer Menge ausgeschieden. In Versuch 8 fehlen sie am dritten und vierten Tage völlig.

Vergleichen wir das Verhältnis der freien zu den gebundenen Phenolen, so ist zu ersehen, daß am ersten oder zweiten Tage nach der Vergiftung

[1]) Pflügers Arch. 13, 285, 1876.

prozentual mehr gebundene Phenole ausgeschieden werden als freie, während vor der Vergiftung die Ausscheidung der freien Phenole erheblich überwog (vgl. Tabelle III und IV). Demnach wird der größte Teil des resorbierten Chloranils als gepaarter Phenolkörper (Tetrachlorhydrochinon) ausgeschieden, wie zu erwarten war. Im großen ganzen gehen die Schwankungen in der Ausscheidung der Gesamtphenole und der Ätherschwefelsäuren parallel. Hydrochinon konnte weder nach *Desesquelle* noch nach *Schmiedeberg* nachgewiesen werden.

Alle bis jetzt beschriebenen Erscheinungen sind als reine Chloranilwirkungen zu betrachten. Mit dem Aufhören der erwähnten Symptome ist die reine Chloranilwirkung abgelaufen, und etwa am dritten und vierten Tage beginnt das zweite Stadium der Intoxikation.

Während dieses zweiten Stadiums, das bis kurz vor Exitus andauert, sind keine besonders auffälligen Krankheitserscheinungen am Tiere zu konstatieren. Bei Vergiftung mit Chl. N. Pr. dauert dieses Stadium vom Beginn der Giftzufuhr an und stellt das erste Stadium der Vergiftung dar. Meist zeigt das Tier in diesem Stadium etwas verminderte Freßlust und nimmt an Körpergewicht ab. Der Urinbefund wird, wenn er durch Zufuhr von t. Chl. verändert worden war, wieder normal.

Im *dritten Stadium* setzen die kurz dauernden akuten Erscheinungen ein, die innerhalb weniger Minuten zum Exitus führen. Das Tier schreit etwa 5 Minuten vor dem Tode einige Male auf, fällt dann auf die Seite, bekommt klonisch-tonische Zuckungen in den Extremitäten und geht ein.

Die durch Chl. N. Pr. verursachten *Veränderungen im Stoffwechsel* sind, nach den vorliegenden Untersuchungen zu schließen, durch einen rasch einsetzenden *Eiweißzerfall* in der Leber bedingt. Der Eiweißzerfall führt zu Anstieg der Rest-N-Stoffe im Blute und vermehrter Ausscheidung der Eiweiß-Abbauprodukte im Urin. Der Urin kann, wie Versuch 15 zeigt, in den ersten Tagen ausschließlich eine Vermehrung des Harnstoffs aufweisen, und erst an folgenden Tagen kommt es zu vermehrter α-Aminosäurenelimination mit gleichzeitigem Sinken der Harnstoffausscheidung. Die Desaminierung genügt hier anscheinend in den ersten Stadien der Vergiftung den erhöhten Anforderungen, später versagt sie.

Auf dieses akute Initialstadium folgt eine Periode, in welcher die Rest-N-Fraktionen im Urin wieder zu normalen oder unternormalen Werten absinken, der N-Verlust wird auf ein Minimum herabgedrückt. Ante mortem steigen die Rest-N-Werte im Blute an; im Urin kommt es nicht zu einem entsprechenden Anstieg der N-Stoffe. Bei Versuch 15 ist der terminal hohe Amino-N-Wert auf die kurz vorher gegebene zweite Giftdosis zurückzuführen.

Vergleichen wir die vorliegenden Urin- und Blutbefunde mit den Angaben bei Phosphor- und Chloroformvergiftung, so finden wir bei akuter Phosphorvergiftung nach den neueren Untersuchungen von *Marshall* und *Rowntree*[1]) am Hunde und *Desqueyroux*[2]) am Meerschweinchen und Kaninchen ähnliche Verhältnisse im Verhalten der N-Stoffe des Urins. Rasch nach der Vergiftung steigt der Total-N an, hauptsächlich durch ein absolutes Anwachsen von Harnstoff und NH_3-N. Der Amino-N steigt erst kurz vor Exitus an. Im Verlauf der Intoxikation verschiebt sich allmählich die prozentuale Zusammensetzung des Total-N zuungunsten des

[1]) Journ. of exper. Med. **22**, 333, 1915.
[2]) C. r. **86**, 143, 1922.

Harnstoff-N und zugunsten des NH_3- und Amino-N. Im Blute wurde bei Phosphorvergiftung kurz vor Exitus eine Zunahme des Reststickstoffs, im wesentlichen bedingt durch Anwachsen der NH_3- und Amino-N-Werte, gefunden. Die gleichen Verhältnisse zeigt die hier beschriebene neue Lebervergiftung. Nach Chloroformvergiftung per os oder subkutan finden *N. Paton*[1]) und *Marshall-Rowntree*[2]) die gleichen Verschiebungen im N-Gehalt des Urins. Nach *Marshall* und *Rowntree* ist die Zunahme des Rest-N im Blute kurz vor dem letalen Ausgang die Folge terminaler Niereninsuffizienz. Diese Erklärung dürfte auch für unsere Befunde zutreffen; es handelt sich dabei nicht um eine spezifische Schädigung der Niere durch Chl. N. Pr.

Die *Todesursache* kann in den hier vorliegenden Versuchen nur in der Leberinsuffizienz liegen. Der kurz vor Exitus nachweisbare Anstieg der Rest-N-Stoffe im Urin genügt zur Erklärung des letalen Ausgangs nicht und Veränderungen an anderen Organen außer der Leber fehlen.

Über pathologische Veränderungen im *Kohlehydratstoffwechsel* bei der beschriebenen Leberschädigung geben einige vorläufige Belastungsproben mit Zuckerzufuhr Auskunft. Aus Versuch 13 ist zu ersehen, daß die alimentäre Hyperglykämie nach *Traubenzucker*zufuhr mit der Dauer der Vergiftung immer mehr den Typus wie beim Diabetiker annimmt. Die Blutzuckerkurve steigt höher an und bleibt länger auf hyperglykämischen Werten. Eine Glucosurie tritt in Versuch 13 auf, als am dritten Tage nach der Giftzufuhr mit Glucose belastet wurde; sie blieb bei der gleichen Traubenzuckerzufuhr 2 Tage vor Exitus aus, obschon die Hyperglykämie länger andauerte. Nach Belastung mit *Lävulose* sind die Differenzen im Verlauf der Blutzuckerkurve vor der Vergiftung und in den verschiedenen Stadien der Vergiftung viel ausgesprochener (vgl. Abb. 2, Versuch 14) als bei Belastung mit Traubenzucker. Auch im Urin tritt nach Lävulose stärkeres Reduktionsvermögen auf als nach Dextrose; die *Seliwanoff*sche Reaktion nimmt gegen den letalen Ausgang hin an Intensität zu (vgl. Tabelle VI, Versuch 14). Diese Feststellung dürfte die Berechtigung der Lävuloseprobe als klinische Funktionsprüfung der Leber stützen. Wie es *Frank* und *Isaak*[3]) und später andere bei der Phosphorvergiftung fanden, traten auch bei der Vergiftung mit Chl. N. Pr. terminal hypoglykämische Werte auf. Der zunehmende Blutzuckerabfall nach der Giftzufuhr geht aus den Abb. 1 und 2 (Versuche 13 und 14) hervor; außerdem wurden in anderen Versuchen ante mortem hypoglykämische Werte bis 0,03 Proz. bestimmt.

Zusammenfassung.

1. Es wurde das Vergiftungsbild mit t. Chl. und Chl. N. Pr. nach Versuchen an zehn Kaninchen beschrieben. Wie aus den pathologisch-anatomischen Untersuchungen, die an anderer Stelle mitgeteilt werden, hervorgeht, liegt im Chl. N. Pr. ein Gift vor, das bei oraler Applikation ausschließlich die Leber schädigt, also ein spezifisches Lebergift darstellt.

2. Durch fortlaufende Urinuntersuchungen wurde die Ausscheidung der gepaarten Phenolkörper nach Eingabe von t. Chl. verfolgt.

---

[1]) Proc. of the Roy. soc. Edinburgh 28, 472, 1907/08.

[2]) Journ. of exper. Med. 22, 333, 1915.

[3]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 64, 274, 1911.

3. Beim Verfolgen des N-Stoffwechsels ergab sich, daß, wie bei Phosphor- und Chloroformvergiftung, in den ersten Tagen nach der Giftzufuhr vorübergehend vermehrt NH_3-N und Amino-N und vermindert Harnstoff im Urin ausgeschieden wird. Terminal stiegen die Rest-N-Fraktionen im Blute an.

4. Kohlehydratbelastungsproben während der Intoxikation weisen auf verminderte Kohlehydrattoleranz hin. Das verminderte Kohlehydratassimilationsvermögen ist besonders auffällig aus dem Verlauf der alimentären Blutzuckerkurve zu ersehen. Die Belastungsprobe mit Lävulose gibt größere Unterschiede in der Toleranz zwischen lebergesundem und leberkrankem Organismus als Belastung mit Dextrose.

Die Vergiftung führt terminal zu Hypoglykämie.

5. Die orientierenden Versuche über Kohlehydratstoffwechsel bei den mit Chl. N. Pr. lebergeschädigten Tieren lassen die Chl. N. Pr.-Vergiftung als Modell zum Studium von Leber-Ausfallserscheinungen, wie bereits in der ersten Mitteilung vorgeschlagen wurde, geeignet erscheinen.

Untersuchungen am Insulin im Reagenzglase.

Von

Erhard Glaser und Georg Halpern.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pharmakognostischen Universitätsinstituts in Wien.)

(Eingegangen am 29. September 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

Von vielen Autoren [*N. R. Blatherwick*, *M. L. Löwy*, *M. Bell*, *Bl. Maxwell*, *E. Hill* (1), *H. Penau* und *Simonnet* (2), *I. Macleod* und *M. Orr* (3), *Ernst Laqueur* (4), *Löwe* (5), *Bouckart* und *Stricker* (6), *Clough*, *Allen* und *Murlin* (7), *Chabanier*, *Lobe Onell* und *Lebert* (8), *Laqueur* und *Snapper* (9), *Fraser* (10), *Eadie* und *Macleod* (11) u. a.] wurde auf die Schwierigkeiten und Unzulänglichkeiten der Wertbestimmung des Insulins hingewiesen, und doch haben sich bisher nur wenige gefunden, die versucht haben, die Ursache derselben, nämlich den individuellen biologischen Faktor auszuschalten und zur Standardisierung des Insulins in vitro überzugehen.

Der Versuch von *Knapp Niederhoff* nach *Kok* (12) war wertlos, da das Insulin in vitro keine Glykolyse herbeiführte. Ebenso fand *Duccesch* (12) wohl ein Schwächerwerden einer 1- bis 2proz. Zuckerlösung, die durch 3 Tage mit und ohne Zusatz von H_2O_2 und einer alkalischen Phosphatlösung zusammen im Brutschrank gelassen wurde; also eine Glykolyse in vitro. Zusatz von Insulin ließ dieselbe aber unbeeinflußt. *J. J. Nitzescu* und *J. Cosma* (13) glaubten zum Ziele zu kommen, indem sie mit der *Thunberg*schen Methylenblaumethode die Einwirkungszeit eines Systems, die Brenztraubensäure oder β-Oxybuttersäure als Natriumsalz, gewaschenen Muskelbrei vom Rind und K_2HPO_4 bei Gegenwart und Abwesenheit von Insulin bestimmten. Sie glaubten aber die dabei auftretende Entfärbung nicht auf Insulin allein beziehen zu können.

Becker (14) hat in einer Mischung, bestehend aus 1 ccm 20proz. Dextroselösung, 6 Einheiten Insulin *Brand*, 1 ccm einer Dinitrophenollösung und 0,5 ccm 25proz. Ammoniak beobachtet, daß die Braunfärbung bei 40° rascher vor sich geht als in Kontrollen ohne Insulin, zu denen schwache Säure in gleicher Konzentration und Menge wie im Insulin zugesetzt waren. Die Braunfärbung wurde in beiden Fällen kolorimetrisch verglichen.

Er schlägt diesen Vorgang zur Auswertung von Insulinpräparaten vor, falls ein Parallelismus zwischen diesem chemischen Prozeß und der physiologischen Wirksamkeit sich herausstellen würde. — *Wyss* (15) gründet seine Insulineichung darauf, daß dieses in spezifischer Weise Phenole vor der Oxydation mit H_2O_2 schützt. Er geht dabei in der Weise vor, daß er sich eine Insulinlösung herstellt, und zwar wird 1 ccm = 10 Einheiten bei p_H 7,5 20fach verdünnt. Von dieser werden acht Reagenzgläser mit je 1 ccm Insulin beschickt, jedem 1 ccm einer 0,2proz. Resorcinlösung sowie aufsteigend 0,25 bis 2 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung (1 ccm = 24 ccm n/100 $KMnO_4$) hinzugefügt, die Gläser auf 5 ccm (p_H 7,5) aufgefüllt und dann für 20 Minuten ins kochende Wasser gestellt. Es wird dann abgelesen, wo Verfärbung eintritt.

Auf diese beiden Methoden wird im Verlaufe unserer Untersuchungen noch zurückgekommen werden.

Lundsgaard und *Holboll* (16) versuchten, den Wirkungswert des Insulins im Reagenzglase festzustellen, indem sie Zuckerlösung mit Insulin und frischem Muskelgewebe (höchstens 2 Stunden alt) versetzten, 1½ Stunden dialysierten und hernach das Reduktions- und Drehungsvermögen bestimmten. Es zeigte sich eine Herabsetzung des Drehungsvermögens, die entweder auf die Bildung der γ-Glucose zurückzuführen ist oder nur in der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen α- und β-Glucose zugunsten der β-Glucose ihren Ursprung hat. Darauf gründen sie ihre Auswertungsmethode. Diese Veränderung ist jedoch für den quantitativen Vorgang nicht maßgebend, da nach Untersuchungen von *Yukichi Osaka* (17) die Geschwindigkeit des Rückgangs des Drehvermögens der α-Glucose, der Konzentration der Hydroxylionen und der Quadratwurzel der H-Ionen annähernd proportional ist.

Eine Methode, um das Insulin im Reagenzglas zur Wirkung zu bringen, könnte nur dann mit Aussicht auf Erfolg durchgeführt werden, wenn man die Verhältnisse, die im Körper beim Zuckerab- bzw. Glykogenaufbau herrschen, möglichst nachzuahmen imstande wäre. Wenn wir die neuesten Theorien bezüglich der Insulinwirkung kritisch überblicken, so sehen wir, daß zur Wirkungsentfaltung des Insulins es noch eines anderen Faktors bedarf, sei es, daß man denselben als Aktivator, Coferment, Katalysator bezeichnet, sei es, daß das Insulin selbst ein Aktivator ist, welcher auf ein im Körper befindliches glykolytisches Enzym einwirkt.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß das Insulin als inneres Sekret auf dem Wege der Blutbahn wirkt und dem Eisen des Hämoglobins darin starke katalytische Eigenschaften zukommen, schienen Versuche in der Hinsicht angebracht, festzustellen, ob das Eisen oder eventuell andere anorganische Katalysatoren, von denen ja früher allgemein angenommen wurde, daß sie normale Bestandteile der Fermente darstellen, das Insulin in vitro zum Zuckerabbau bzw. zum Überführen des Zuckers in eine andere Form veranlassen können.

Schon bei *Woker* (17) finden wir die Untersuchungen *Lothar Meyers* über die beschleunigende Wirkung der Schwermetallsalze auf die Oxydation zitiert, wobei er als die wirksamsten die Salze jener Metalle fand, die leicht

aus einer Oxydationsstufe in die andere übergehen. Nach der Stärke ihrer Wirksamkeit kommen in absteigender Linie Mn, Cu, Fe, Co, Ni, Zn und Cd zu stehen.

Die Versuche wurden in der Weise vorgenommen, daß in Meßkölbchen zu 50 ccm, 10 ccm einer 5proz. Glucoselösung, 2 oder 4 ccm einer Insulinlösung gegeben wurden, wobei 2 ccm eine Torontoeinheit enthalten. Es wurde tropfenweise eine bestimmte Menge von dem für den jeweiligen Versuch bestimmten Katalysator dazugegeben und hierauf bis zur Marke aufgefüllt. Die Kölbchen wurden 24 Stunden bei Brutschranktemperatur gehalten und denselben nachher je 10 ccm für die Zuckerbestimmung entnommen. Dann wurden die Kölbchen neuerlich zur weiteren Einwirkung in den Brutschrank zurückgestellt und nach 12 bis 24 Stunden wiederum Proben von je 10 ccm für die Zuckerbestimmung entnommen. Der Zuckergehalt wurde in Gärungsröhrchen bestimmt.

Das Resultat dieser Versuche ist aus Tabelle I zu ersehen.

Die Versuche sind mit Insulin „Phiag" (1 E. = 60 mg) ausgeführt. Die Lösung des Insulins gibt eine schwache $Fe^{\cdots}$-Reaktion. Die Versuche sind in eigensaurer Lösung vorgenommen worden.

Tabelle I.

Art der untersuchten Flüssigkeit	Gärung in Proz.	
	nach 24 Stdn.	nach 36 Stdn.
Zuckerkontrolle (ohne Insulin und ohne Katalysator) . .	0,98	0,98
Zuckerlösung mit 1 E. Insulin ohne Katalysator	0,82	0,72
„ „ 2 Tropfen Eisenchlorid ohne Insulin .	0,98	0,98
„ „ 1 E. Insulin und 1 Tropfen Eisenchlorid	0,40	0,40
„ „ 1 E. „ „ 2 „ „	0,20	0,20

Daraus ergibt sich, daß dem Insulin allein nur eine geringe Wirksamkeit auf die Zuckerlösung zukommt, wobei hervorgehoben werden muß, daß das verwendete Insulin selbst eine schwache Eisenreaktion gab. Zugesetztes Eisenchlorid konnte die Insulinwirkung bedeutend verstärken. Es mußte daher untersucht werden, ob durch weitere Zugaben von Eisen und durch Verstärkung der Insulindosis sich Differenzen im Sinne einer Leistungssteigerung erzielen lassen.

Die weiteren Versuche wurden mit Insulin „Chemosan" (10 mg = 1 Einheit) ausgeführt. Die Lösung des Insulins gibt keine Eisenreaktion und hat p_H 4,7. Um ein Ausfallen des zugesetzten Salzes zu verhindern, muß man die Gesamtacidität der Lösung auf p_H 4 bis 3,5 bringen (mit einem Tropfen n/10 HCl-Lösung). Versuche, bei denen das Eisensalz nach 24 Stunden ausfiel oder in denen nur eine Trübung entstand, waren in der Wirkung abgeschwächt bzw. ganz unwirksam.

Tabelle II.

Variation der Insulinmenge ohne Katalysator.

Art der untersuchten Flüssigkeit	Gärung in Proz.	
	nach 24 Stdn.	nach 36 Stdn.
Zuckerlösung ohne Insulin	1,05	1,00
„ mit 1 E	1,05	1,00
„ „ 2 E	1,05	1,00
„ „ 6 E	1,05	1,00

Aus der Tabelle II ist zu entnehmen, daß das Insulin in Übereinstimmung mit den Versuchen von *Knapp-Niederhoff* ohne Eisen überhaupt keine Wirkung ausübt.

Tabelle III.

Art der untersuchten Flüssigkeit	Gärung nach 24 Stunden	Wiederholung desselben Versuchs I	Wiederholung desselben Versuchs II
1proz. Zuckerlösung ohne Zusatz	1,05	1,05	1,05
Zuckerlösung mit 1 E. und 2 Tropfen Eisenchlorid	0,50	0,70	0,80
Zuckerlösung mit 1 E. und 3 Tropfen Eisenchlorid	0,65	0,72	0,90
Zuckerlösung mit 1 E. und 4 Tropfen Eisenchlorid	0,70	0,30	—
Zuckerlösung mit 1 E. und 5 Tropfen Eisenchlorid	0,70	0,50	—
Zuckerlösung mit 1 E. und 6 Tropfen Eisenchlorid	0,72	0,60	—
Zuckerlösung mit 2 E. und 1 Tropfen Eisenchlorid	0,80	0,50	—
Zuckerlösung mit 2 E. und 2 Tropfen Eisenchlorid	0,73	0,50	0,80
Zuckerlösung mit 3 E. und 3 Tropfen Eisenchlorid	0,75	0,70	—
Zuckerlösung mit 5 E. und 3 Tropfen Eisenchlorid	0,70	—	—

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß zweifellos eine katalytische Wirkung des Eisens vorliegt, jedoch sind die Differenzen in den gleichen Versuchen trotz Einhaltens gleicher Versuchsbedingungen, insbesondere auch der Ionenkonzentration, so verschieden, daß irgendwelche bindende Schlüsse daraus nicht gezogen werden können.

Bei der Untersuchung der Franzensbader Mineralquellen gelang es *Baudisch* und *Welo* (18) nachzuweisen, daß die besondere Wirksamkeit derselben an der Quelle auf den Gehalt an aktivem Eisen, welches sie durch die Benzidinreaktion, Einfluß auf Bakterienwachstum und

Absorption von Sauerstoff charakterisierten, zurückzuführen sei. Diese Mitteilungen ließen es möglich erscheinen, bei Anwendung eines solchen bei unseren Versuchen zu konstant meßbaren Zahlen zu gelangen.

Das aktive Eisen wurde nach dem Verfahren von *Lefort* in der Weise hergestellt, daß molare Mengen eines Ferro- und Ferrisulfats mit Natronlauge gefällt wurden. Das ausgefallene Hydroxyd wurde filtriert und bei 100° getrocknet. Das resultierende Fe_3O_4 gab eine starke Benzidineisessigreaktion. Die Versuche mit diesem Eisen wurden folgendermaßen ausgeführt: In je 5 ccm des Acetatpuffers p_{H} 4,7 wurden Spuren des wirksamen Fe_3O_4 gelöst, nachher wurden 2 ccm einer 10proz. Glucoselösung und die entsprechende Menge Insulin dazugegeben und das ganze auf 10 ccm aufgefüllt. In ein Kölbchen übertragen, wurde es 24 Stunden bei 37° stehengelassen, sodann auf 50 ccm ergänzt und von dieser Menge die Zuckerbestimmungen in der obigen Weise mittels Gärung gemacht.

Es ergaben sich *keine Differenzen* zwischen dem blinden und dem Insulinversuch.

Als weitere Katalysatoren wurden auch $NiCl_2$ als H-Überträger, $Al_2(SO_4)_3$, dessen racemisierende Eigenschaften bekannt sind, weiters auch Mangan und Chromsalze, Hämalbumin und Muskelpreßsaft in vielen Versuchen geprüft. Hämalbumin wurde deshalb verwendet, weil es dem Blute entstammt, eisenhaltig ist und doch keine Eisenionenreaktion gibt. Vom Muskelpreßsaft wird von *Lundsgaard* (16) und *Schittenhelm* (19) behauptet, daß demselben die Eigenschaften eines Coferments gegenüber dem Insulin zukommen. Die Versuche zeigten durchweg ein *negatives Resultat*, weshalb die Anführung des Untersuchungsprotokolls unterlassen wird.

Nach *Strecker*, *Dakin* u. a. (20) sollen sich im Stoffwechsel, insbesondere beim Abbau der Aminosäuren und des Zuckers, gekoppelte Reaktionen im Sinne einer Oxydoreduktion vollziehen, wobei der Vorgang in der Weise sich abspielt, daß zwei Stoffe vorhanden sind, die sich gegenseitig reduzieren bzw. oxydieren können und wobei derjenige Hilfsstoff, der den Wasserstoff bzw. Sauerstoff aufnimmt, Akzeptor genannt wird. Für unseren Fall kommen als solche jene Stoffe in Betracht, welche im perpetuum mobile des Zuckerumsatzes entstehen und welche im Körper durch Insulin neben dem Zucker im Harn verschwinden, das wären also die Acetonkörper und als erster Repräsentant derselben das Aceton selbst. Die Versuche sind in nachfolgender Tabelle IV übersichtlich dargestellt, wobei bemerkt werden muß, daß hier die Zuckerbestimmung nach der Mikrobangmethode ausgeführt, dagegen das Aceton nach Trennung von Zucker durch Destillation nach der Methode von *Messinger* bestimmt wurde. Die verschiedenen Versuchsbedingungen sind aus derselben ebenfalls zu entnehmen.

Tabelle IV.

Art der Lösung	Resultat des blinden Versuchs (ohne Insulin)		Resultat des Vollversuchs		p_H der Lösung
	Zucker Proz.	Aceton in ccm n/10 Jodlösung	Zucker Proz.	Aceton in ccm n/10 Jodlösung	
0,4 Proz. Zuckerlösung, 0,2 ccm Aceton, 2 E. Insulin „Phiag"	0,39	8,5	0,38	8,6	5,5 (Acetatpuffer)
0,4 Proz. Zuckerlösung, 0,2 ccm Aceton, 0,1 ccm 5proz. $FeCl_3$, 3 E. Insulin (Chem.)	0,36	8,6	0,41	8,8	4,9 (Acetatpuffer)
0,4 Proz. Zuckerlösung, 0,2 ccm Aceton, 5 ccm n/10 Na_2CO_3, 3 E. Insulin „Phiag"	0,36	16,6	0,39	16,8	9,1
0,4 Proz. Zuckerlösung, 0,2 ccm Aceton, 1 ccm n/10 Na_2CO_3, 3 E. Insulin „Phiag"	0,40	8,3	0,36	8,4	7,5
0,4 Proz. Zuckerlösung, 0,2 ccm Aceton, 0,1 ccm $FeCl_3$ (5proz.), 4 E. Insulin „Phiag"	0,37	8,4	0,42	8,2	5,1 (Acetatpuffer)
1 Proz. Zuckerlösung, 0,2 ccm Aceton, akt. Fe_3O_4, gel. in 1 Tropf. n/10 HCl + KCl, 2 E. Insulin (Chem.)	0,96 (*Bang*) 0,99 (Gärung)	8,5	0,95 (*Bang*) 0,82 (Gärung)	8,4	3,8
Dasselbe mit 2 Tropfen Hypnon statt Aceton	0,96 (*Bang*) 0,99 (Gärung)	—	0,98 (*Bang*) 0,92 (Gärung)	—	3,8
0,4 Proz. Zuckerlösung, 1 ccm Aceton, 1 ccm $NiCl_2$ (1proz.), 2 E. Insulin (Chem.)	0,4 (Gärung)	—	0,03 (Gärung)	—	6,5

Aus demselben erhellt, daß weder im Reduktionsvermögen noch am Acetongehalt eine Änderung durch Insulinwirkung zu erzielen ist, selbst wenn durch Änderung der p_H ein möglichst günstiges Milieu zu schaffen versucht wurde; dagegen zeigen die Gärungsversuche eine unbedeutende, jedoch nicht einheitliche Abnahme des Gärvermögens der Glucose.

Aus unseren bisherigen Versuchen kann ersehen werden, daß wohl in einzelnen Fällen eine Beeinflussung der Insulinwirkung durch Katalysatoren (Eisen, Nickel) statthat, aber eine Gesetzmäßigkeit unter den angewandten Bedingungen nicht zu erzielen war. Hierbei

kann aber doch so viel gesagt werden, daß sich eine Abnahme der Gärfähigkeit feststellen läßt, in keinem Falle aber eine Änderung des Reduktionsvermögens zu bemerken war. Es könnte dieser Umstand so gedeutet werden, daß bei derartiger Einwirkung der Zucker in eine nicht oder schwer vergärbare Form übergeführt wird, was im Einklang mit der Tatsache stünde, daß die nicht gärungsfähigen Anhydrozucker im diabetischen Stoffwechsel leichter abgebaut werden als die Glucose.

II.

Da eingangs erwähnte Autoren (*Wyss*, *Becker*) positive Versuche mit Insulin in vitro anstellten, jedoch sich im unklaren waren, ob es sich um eine spezifische Wirkung desselben handelt, schien es uns von Wichtigkeit, in dieser Frage Klarheit zu schaffen. Es wurden daher ihre Versuche einer Nachprüfung unterzogen, wobei, um Mißverständnisse zu vermeiden, Parallelversuche mit frischem und durch Kochen inaktiviertem Insulin angestellt wurden.

Die nach *Becker* angestellten Versuche gehen aus Tabelle V hervor. Die Ziffern bedeuten die Stärke der Braunfärbung, wobei 1 die schwächste, 4 die stärkste Verfärbung darstellt. Kontrolliert wurden die Farben nach einer Einwirkungsdauer von 30 Minuten. Untersucht wurde Insulin von verschiedener Provenienz.

Tabelle V.

Ohne Insulin	Mit Insulin Sanabo 7 E. (flüssig)	Dasselbe Insulin gekocht	Insulin Sanabo (Tablett.) 6 E.	Insulin Sanabo (Tablett.) 10 E.	Insulin Chemosan 6 E. = 60 mg	Insulin Sanabo (flüssig) 10 E.	Insulin Phiag 10 E. = 50 mg	Albumin aus Blut 10 mg
3	3	3	4	3	1	4	3	2

Wir sehen daraus deutlich, daß die Wirkung mit der angegebenen Wertigkeit in keinem Zusammenhang steht. Manchmal bleibt in bezug auf den blinden Versuch dieselbe ganz aus, manchmal dagegen übt das Insulin analog dem Eiweiß eine verzögernde Wirkung auf die Reaktion aus.

Als direkt falsch erwiesen sich die Voraussetzungen in der *Wyss*schen Methode, welche die Verzögerung der Oxydation einer Resorcinlösung mit H_2O_2 durch Insulin als Auswertungsverfahren annimmt. Das Resultat der Nachprüfung ist in nachstehender Tabelle VI niedergelegt, wobei wiederum die Ziffern 1 bis 10 die Verfärbung in steigendem Maße wiedergeben. Nach 20 Minuten Aufenthalt der Eprouvetten im kochenden Wasser wurde abgelesen.

Tabelle VI.

Verhältnis des $H_2O_2 : H_2O$ in ccm	Blinder Versuch	Mit Insulin Sanabo 20 ccm = 20 E.	Mit Insulin Sanabo gekocht 20 ccm = 20 E.
0,25 : 2,75	7	3	1
0,50 : 2,50	7	3	1
0,75 : 2,25	8	4	2
1,00 : 2,00	8	4	2
1,25 : 1,75	9	5	3
1,50 : 1,50	9	5	3
1,75 : 1,25	10	6	5
2,00 : 1,00	10	6	5

Es zeigt sich, daß das inaktivierte Insulin die Reaktion stärker verzögert als das frische, wirksame. Dadurch erscheint bewiesen, daß die verzögernde Wirkung nicht dem Ferment Insulin zukommt.

Um jetzt festzustellen, warum Zusatz von Insulin oder anderen Stoffen, wie abgebautes Eiweiß, eine Beschleunigung bzw. Verzögerung der Reaktion ausüben, haben wir uns einer Methode bedient, welche die früheren an Genauigkeit weit übertrifft. Dieselbe beruht auf einwandfreien chemischen Reaktionen, welche sich genau titrimetrisch verfolgen lassen, und ist dadurch ausgezeichnet, daß die verschiedenen Zuckerarten eine verschieden große Beschleunigung der Oxydation herbeiführen. Wenn sich eine spezifische Wirkung herausgestellt hätte, wären wir dadurch in der Lage gewesen, die sich gebildete Zuckerart zu charakterisieren.

Die Untersuchung wurde nach der Methode von *R. Kuhn* und *T. Wagner-Jauregg* (20) folgendermaßen ausgeführt: 5 g Glucose (purissimum *Merck* p. infusione) werden pro Versuch in etwas destilliertem Wasser gelöst, quantitativ in ein 100 ccm fassendes Meßkölbchen gebracht und 10 ccm einer m/15 Phosphorsäure und 10 ccm m/15 Primärkaliumphosphat dazugegeben. Das etwa halbvolle Meßkölbchen wird sodann in einen Thermostaten bei einer Temperatur von 18° gebracht. Nachdem ein Temperaturausgleich eingetreten ist, werden 20 ccm einer auf 18° vorgewärmten n/10 $KMnO_4$-Lösung dazugesetzt und sofort mit 18° warmem Wasser aufgefüllt. Die Flüssigkeiten werden gut gemischt und von dem Moment an die Einwirkungsdauer gerechnet. Nach gemessenen Zeiten werden Proben von je 10 ccm in ein Erlenmeyerkölbchen entnommen, in dem sich bereits 15 ccm eines m/15 Phosphorsäure-m/15 Primärkaliumphosphatgemischs (1 : 1) und 2 ccm einer 5proz. KJ-Lösung befinden, gegeben. In dem Augenblick, wo das überschüssige Kaliumpermanganat mit dem Kaliumjodid in Reaktion getreten ist, ist die Einwirkungsdauer beendet. Unter Zusatz von 2 Tropfen Stärke wird dann das ausgeschiedene Jod mit einer n/50 Natriumthiosulfatlösung titriert. Der Zusatz von Säurepuffer ist notwendig, um das ausgeschiedene MnO_2 in Lösung zu bringen. Nach etwa 2 bis 3 Minuten ist die Lösung vollkommen klar und titrationsfähig. Alle Versuche wurden unter denselben Bedingungen ausgeführt, und das zugesetzte Insulin und Eiweißkörper wurden vor Beigabe in die Lösung mit 1 bis 2 Tropfen Soda-

lösung neutralisiert, um die Ionenkonzentration, von welcher die Reaktion abhängig ist, nicht zu ändern; doch ist diese Vorsichtsmaßregel unnötig, da die Pufferung genügend stark ist. Die Versuche sind aus nachfolgenden Tabellen und zwei Kurven zu ersehen.

Tabelle VII.

Blinde Versuche. Temperatur 18° C.

5proz. Glucoselösung mit Puffer		5proz. Glucoselösung mit Puffer	
Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm
5′	9,5	5′	9,55
11	8,7	15	8,55
20	8,4	25	7,9
35	7,2	35	7,35
55	6,0	58	5,9
1h10	5,1	1h30	4,55
1 30	4,5	1 50	3,8
1 50	3,8	2 50	2,6
3 05	2,4	5	1,8

Tabelle VIII.

Temperatur 18° C.

Mit 6 E. Insulin Chemosan (60 mg)		Mit 6 E. Insulin Chemosan (60 mg)		Mit 6 E. Insulin Chemosan (60 mg) gekocht 10 Min.		Mit 6 E. Insulin Chemosan (60 mg) gekocht 1 Stunde am Rückfluß	
Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm
5′	7,6	6′	7,5	10′	7,4	10′	7,35
10	7,1	15	6,4	20	6,7	25	6,5
20	6,7	20	6,8	35	5,9	35	6,0
30	6,0	35	5,5	50	5,0	50	4,8
55	4,6	45	5,05	1h15	3,55	1h10	3,6
1h30	3,0	55	4,55	1 30	2,8	2 25	1,8
1 50	2,5	1h20	3,1	1 51	1,9	3	1,2
2 10	1,7	1 50	2,2	2 05	1,65	—	—
—	—	3 25	1,05	3 50	1,0	—	—

Diese Versuche zeigen, daß das Insulin auf die Oxydation beschleunigend einwirkt, jedoch lassen sich Unterschiede in der Richtung nicht feststellen, ob sie mit aktivem oder inaktivem Insulin gemacht wurden. Im übrigen scheint es, daß die Wirkung von der Substanzmenge des Eiweißes bzw. dessen Abbauprodukte abhängt, weswegen die nachfolgenden Versuche gemacht wurden.

Tabelle IX.
Temperatur 18° C.

Mit 5 E. Insulin Phiag (10 mg)		Mit 5 E. Insulin Phiag (10 mg) 1/2 Stunde am Rückfluß gekocht		Mit 10 E. Insulin Sanabo (0,5 mg)		Mit 10 E. Insulin Sanabo (0,5 mg) 1/2 Stunde am Rückfluß gekocht	
Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm
8′	8,6	5′	8,9	5′	8,9	5′	9,0
17	8,2	15	8,1	15	8,3	16	8,4
33	7,1	35	7,2	30	7,2	30	7,45
48	6,25	50	6,4	45	6,15	50	6,05
1h10	4,9	1h15	4,8	1h	5,45	1h40	3,4
1 30	4,1	1 30	4,3	1 25	4,45	2 30	2,6
1 50	3,2	1 50	3,1	1 40	3,6	3 30	2,05
3	1,6	3	1,5	2	3,25	—	—
—	—	—	—	5	1,75	—	—

Tatsächlich ist mit der Abnahme der Substanzmenge von 60 auf 0,5 mg auch eine Abnahme der Wirkung zu bemerken. Es ist auch deutlich zu sehen, daß das wirksamste Insulin (Sanabo) fast keine Wirkung ausübt, obgleich es in einer biologisch stärkeren Dosis verwendet wurde.

Um zu prüfen, ob eine lange Einwirkungsdauer des Insulins (24 Stunden bei 37°) von Bedeutung ist, wurde die Oxydation einer Glucoselösung, welche gepuffert und nicht gepuffert gestanden ist, gemessen, nachher dieselbe mit Insulin Sanabo (20 Einheiten = 1 mg) nach 24stündiger Einwirkung bei neutraler Reaktion ohne und mit Puffer versucht.

Tabelle X.
Temperatur 18° C.

Glucoselösung, gestanden 24 Stunden bei 37° ohne Pufferung		Glucoselösung, gestanden 24 Stunden bei 37° mit Pufferung		Insulin Sanabo 10 E. (0.5 mg) durch 24 Stdn. bei 37° in ungepufferter Glucoselsg. gestanden		Insulin Sanabo 10 E. (0,5 mg) durch 24 Stdn. bei 37° in gepufferter Glucoselsg. gestanden	
Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm
10′	8,6	10′	8,7	10′	8,85	5′	9,0
30	7,25	20	8,1	20	8,25	20	8,2
45	6,35	35	7,15	35	7,1	30	7,4
1h	5,5	55	6,0	55	5,85	50	6,0
1 40	3,9	1h15	4,9	1h15	4,7	1h40	3,45
2	5,6	1 45	3,7	1 45	3,5	2 30	2,45
5	1,85	2 30	2,75	2 30	2,5	3	2,15
5 40	1,55	3	2,3	3	2,2	—	—

Aus demselben geht hervor, daß auch durch eine längere Einwirkungsdauer des Insulins keine Änderung der Oxydationsgeschwindigkeit gegenüber Tabelle IX statthat, wobei es gleichgültig ist, bei welcher p_H es zur Einwirkung gebracht wurde.

Wenn wir in den früheren Versuchen bereits feststellen konnten, daß die Oxydationswirkung von der Menge des kolloidal gelösten Eiweißes bzw. dessen Abbauprodukte abhängig war, so mußten sich auch Verschiedenheiten nach der Art der Abbaustufe des Eiweißes bzw. der Größe des Moleküls desselben ergeben. Zu diesem Zwecke wurden Versuche mit Albumin, Albumose, Pepton und zuletzt mit einem bereits kristallisierten Abbauprodukt desselben einer Aminosäure (Glykokoll) vorgenommen.

Tabelle XI. Temperatur 18° C.

Mit Albumin aus Blut (60 mg)		Mit Albumose (60 mg)		Mit Pepton (60 mg)		Mit Glykokoll (60 mg) neutralisiert mit Sodalösung	
Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm	Einwirkungsdauer	Verbrauchte Menge n/50 $Na_2S_2O_3$ ccm
5'	7,1	5'	6,8	5'	6,4	5'	9,5
15	6,1	10	6,15	10	5,8	10	8,7
25	5,5	25	5,1	20	4,95	20	8,1
35	5,05	35	4,8	35	4,05	30	7,6
50	4,15	50	3,75	45	3,5	40	7,15
1h05	3,65	1h05	3,2	1h05	2,65	1h20	5,0
1 30	2,7	1 30	2,4	1 30	1,9	1 50	3,7
2	2,1	1 45	2,15	2	1,65	—	—
2 30	1,75	2	1,8	—	—	—	—

Es ist ersichtlich, daß mit der Abnahme der Größe des Moleküls die oxydationsbeschleunigende Wirkung zunimmt; Kristalloide üben keinen Einfluß auf die Reaktion aus. Eine Erklärung für dieses Verhalten des Eiweißes bzw. der kolloidalen Abbauprodukte desselben dürfte in der Eigenschaft der kolloidalen Systeme bezüglich der Löslichkeit dritter Substanzen zu suchen sein.

Kurz soll noch angeführt werden, wie die bei den Versuchen verwendeten Agenzien sich gegen Millon und Biuret verhalten haben.

Tabelle XII.

Agens	Millon	Biuret
Insulin Chemosan . . .	+	negativ
Insulin Phiag	+ schwach	"
Insulin Sanabo	+	"
Albumin	++	++ violett
Albumose	++	++ "
Pepton	++	++ "

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Untersuchungsresultate in zwei Kurven festgehalten, und zwar in der einen die verschiedenen Insulinpräparate in verschiedenen Substanzmengen, bei der anderen die verschiedenen Eiweißstoffe.

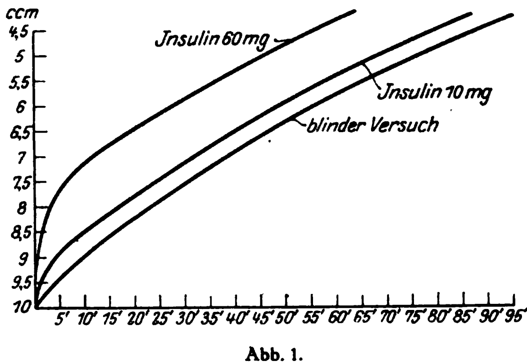



Abb. 1.

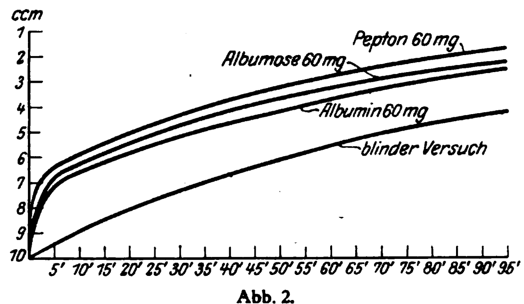


Abb. 2.

Aus den Kurven ist deutlich zu sehen, daß durch Zusatz von Eiweißstoffen bzw. Insulin die Reaktion am Anfang stark beschleunigt wird, im weiteren Verlaufe aber die Kurven parallel gehen.

Wenn wir nun das Ergebnis vorstehender Untersuchungen überblicken, so ergibt sich daraus folgende

Zusammenfassung.

Es wurden Versuche, 1. Insulin im Reagenzglas durch Katalysatoren zur Wirkung zu bringen, angestellt, wobei sich Eisen und in manchen Fällen auch Nickelsalz als wirksam erwiesen. Hierbei konnte eine Abnahme des Gärvermögens des Zuckers festgestellt werden, wogegen sich in bezug auf das Reduktionsvermögen keine Änderung ergab. Daß die Abnahme der Gärfähigkeit den Zucker durch den Organismus leichter abbaufähig macht, ist durch die Tatsache erwiesen, daß die nicht gärfähigen Anhydrozucker im diabetischen Stoffwechsel leichter zum Abbau gebracht werden als Glucose.

2. Bei Aceton unter verschiedenen Bedingungen, als Akzeptor für den Zuckerabbau mit Insulin, als reaktionsvermittelnde Substanz verwendet, konnte in keinem Falle eine gegenseitige Einwirkung festgestellt werden.

3. Die bisherigen Einwirkungsmethoden des Insulins in vitro wurden in der Richtung nachgeprüft, ob es sich bei der oxydationsverzögernden oder beschleunigenden Wirkung um eine spezifische des Insulins handelt. Es konnte dabei erwiesen werden, daß die Wirkung des Insulins keine biologische bzw. für dasselbe charakteristische ist. Um festzustellen, um was für eine Wirkung es sich hierbei handelt, wurden Versuche mit einer titrimetrisch genau zu verfolgenden Methode angestellt. Die Resultate zeigen deutlich, daß

a) aktives und inaktives Insulin die gleiche Wirkung haben,

b) die Einwirkung von der Substanzmenge abhängt,

c) Eiweißstoffe ähnlich wirken, und zwar das kleinste Eiweißmolekül am stärksten,

d) kristalloide Abbauprodukte des Eiweißes (Aminosäuren) keinen Einfluß auszuüben imstande sind.

Literatur.

1) *N. R. Blatherwick, M. L. Löwy, M. Bell, B. Maxwell* und *E. Hill*, Journ. of biol. chem **59**, 36, 1924. — 2) *Pénau* und *Simonnet*, Journ. de pharm. et de chim. **29**, 473. — 3) *J. R. Macleod* und *M. Orr*, Journ. of laborat. a chim. med. **9**, 591, 1924. — 4) *E. Laqueur*, Deutsch. med. Wochenschrift 1924, S. 531. — 5) *Löwe*, ebendaselbst 1924, S. 332. — *Bouckart* und *Stricker*, C. r. de seances de la soc. de biolog. **90**, 100; **91**, 952, 1924. — 7) *Clough, Allen* und *Murlin*, Amer. Journ. of Phys. **68**, 213, 1924. — 8) *Chabanier, Lobe Onell, Lebert*, Bull. de l'Acad. 1923, S. 530. — 9) *Laqueur* und *Snapper*, Nederlandsch Tydschr. v. Geneok. **67**, 2902, 1923. — 10) *Fraser*, Journ. of laborat. a chim. med. **8**, 425. — 11) *Eadie* und *Macleod*, Amer. Journ. of Phys. **64**, 285, 1923. — 12) *J. Kok*, Pharmakol. Weekblad 1924, S. 345. — 13) *J. J. Nitzescu* und *A. J. Cosma*, C. r. **90**, 1077, 1924. — 14) *Becker*, Zentralbl. f. inn. Med. 1924, S. 634. — 15) *F. Wyss*, C. r. **181**, 327, 1925. — 16) *Lundsgaard* und *Holboll*, Journ. of biol. Chem. **62**, 454, 1924. — 17) Siehe *Woker*, Die Katalyse, S. 124, Stuttgart 1910. — 18) *Baudisch* und *Welo*, Die Naturwissenschaften 1925, S. 749. — 19) *Schittenhelm*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925. — 20) Siehe *Oppenheimer*, Stoffwechselfermente, Braunschweig 1915. — 21) *R. Kuhn* und *T. Wagner-Jauregg*, Berl. Ber. **46**, 500, 1925.

Über Photoxydationen mittels fluoreszierender Farbstoffe.

Von

Hans Gaffron.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 29. September 1926.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Seit der Entdeckung der photodynamischen Erscheinung durch *H. v. Tappeiner* ist die Wirkung optischer Sensibilisatoren studiert worden (*Busck*, *Hausmann*, *Jodlbauer*, *Metzner* und viele andere). Die ersten Mitteilungen über die Wirkung fluoreszierender Farbstoffe in vitro stammen von *Straub*[1]. *C. Neuberg* untersuchte im Verlauf seiner Arbeiten über lichtkatalytische Reaktionen das Verhalten von Sensibilisatoren gegenüber organischen Substanzen[2]. Er fand, daß Derivate des Anthrachinons, ganz ihrer Wirkung auf Paramäcien entsprechend, viele organische Verbindungen veränderten, z. B. Alanin zu Aldehyd und Ammoniak oxydierten. Neuerdings hat *Noack* nachgewiesen, daß Eosinlösungen eine rasche Photoxydation pflanzlicher Chromogene bewirken[3]. Ganz gleiche Eigenschaften besitzt auch Chlorophyll, wie *Noack* letzthin gezeigt hat[4]. In allen eben erwähnten Fällen war ein Oxydationsvorgang dadurch erwiesen, daß die betreffenden „Akzeptoren" Veränderungen erlitten, ähnlich den durch Einwirkung von Peroxyden oder anderen Oxydationsmitteln entstandenen.

Vor einiger Zeit nun konnte ich berichten, daß Serum, welches ich nach Zusatz geringer Mengen von Hämatoporphyrin dem Tageslicht oder den Strahlen einer Metallfadenlampe aussetzte, lebhaft Sauerstoff absorbierte, wobei eine Oxydation der Serumproteine eintrat[5]. Die näheren Untersuchungen über diese Reaktion bilden den Gegenstand der folgenden Seiten.

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **51**, 883, 1904.

[2]) Diese Zeitschr. **61**, 315, 1914; vgl. auch **13**, 305; **17**, 270; **27**, 271; **29**, 297; **39**, 158; **44**, 495.

[3]) Zeitschr. f. Bot. **12**, 273, 1923.

[4]) Naturwiss. **14**, 385, 1926.

[5]) Ebendaselbst **18**, 1925, Heft 41.

Im übrigen sei auf die große Zusammenfassung von *L. Pincussen*, Ergebn. d. Physiol. **19**, 80, 1921, verwiesen.

Inhalt.

I. Anordnung der Versuche. Methodisches.

Die Versuche scheiden sich in Gasanalysen und manometrische Messungen. Als Versuchsgefäße dienten an Manometer angeschlossene Kästchen[1]) (Abb. 1) und Rezipienten[2]) (Abb. 2), die innerhalb eines

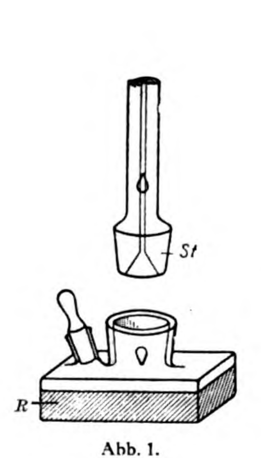


Abb. 1.

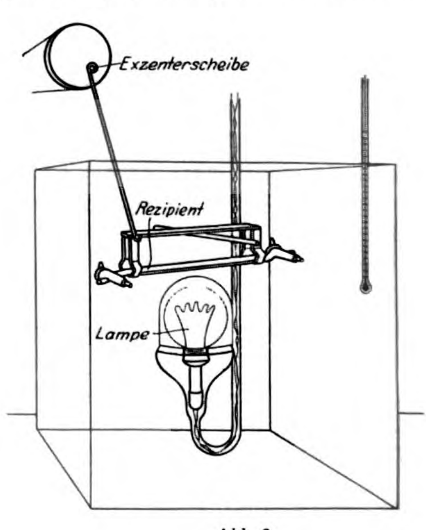


Abb. 2.

Thermostaten belichtet und dabei so rasch geschüttelt wurden, daß zu jeder Zeit zwischen Gasraum und Flüssigkeit praktisch Gleichgewicht herrschte. Die Gasfüllung der Gefäße waren Sauerstoffgemische bekannter Zusammensetzung, deren Änderung in den Rezipienten durch Gasanalysen, in den Manometern durch Messen der Druckabnahme verfolgt werden konnte. Die Ablesung am Manometer erfolgte entweder nach einer gewissen Ausgleichszeit fortlaufend im

[1]) Nach *O. Warburg*, diese Zeitschr. **152**, **51**, **1924**.
[2]) Nach *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 1919.

Hellen oder vor und nach einer Belichtung im Dunkeln. Betreffs der Gasanalysen sei auf die Arbeiten von *O. Warburg* und *E. Negelein*[1]) verwiesen.

Als Lichtquelle benutzte ich Metallfadenlampen; deren Strahlung ist — im Gegensatz zum Sonnen- und Quecksilberdampflicht — äußerst arm an Ultraviolett. Bei Versuchen über optische Sensibilisierung muß die Einwirkung kurzwelligen Lichtes auf organische Substanz von dem Vorgang der Sensibilisierung so scharf als möglich getrennt werden. Es soll daher das Licht nur vom sensibilisierenden Farbstoff, nicht aber vom Akzeptor absorbiert werden. Die Verwendung einer an Ultraviolett reichen Lichtquelle würde z. B. im System Eiweiß + Hämatoporphyrin zu falschen Ergebnissen führen, weil Ultraviolett vom Hämatoporphyrin wenig[2]), vom Eiweiß jedoch stärker absorbiert wird.

Die verwendeten Farbstoffe waren reine Präparate der Firma vorm. Meister, Lucius und Brüning. Hämatoporphyrin und kristallisiertes Äthyl-Chlorophyllid waren nach *Willstätter* dargestellt worden.

Berechnung[3]): In dem Falle, daß ein Gas, hier Sauerstoff, im Manometer verschwindet, berechnet sich dessen Menge — X_{O_2} — 0°, 760 mm Hg — aus der abgelesenen Druckänderung h und der Gefäßkonstanten K.

K ist gegeben durch

$$\frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0}$$

(T absolute Temperatur des Thermostaten, V_g Volumen des Gasraumes bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit, V_f Flüssigkeitsvolumen der Versuchslösung, α *Bunsen*scher Absorptionskoeffizient des betreffenden Gases, P_0 Normaldruck in Millimetern Sperrflüssigkeit.)

$$X_{O_2} = h \,.\, K_{O_2} \tag{1}$$

Ist jedoch mit der Sauerstoffaufnahme eine Abgabe von Kohlensäure verbunden, so gilt statt des vorstehenden folgender Ausdruck

$$X_{O_2} = h \cdot \left(\frac{K_{CO_2} \,.\, K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma \cdot K_{O_2}} \right). \tag{2}$$

K_{CO_2} ist die Gefäßkonstante für Kohlensäure, entsprechend K_{O_2}. γ bezeichnet das Verhältnis der $\frac{\text{Menge Kohlensäure}}{\text{Menge Sauerstoff}}$ oder X_{CO_2}/X_{O_2}.

[1]) Diese Zeitschr. **110**, 70, 1920.

[2]) *Th. van der Bom*, Recherches sur la Fluorescence de l'Hématoporphyrine. Fribourg. Imp. St. Paul 1924.

[3]) Nach *O. Warburg*, diese Zeitschr. **100**, 230, 1919; **152**, 51, 1924.

Dieses Verhältnis ist, da X_{O_2} negativ, X_{CO_2} positiv, selbst negativ und wurde in unserem Falle auf gasanalytischem Wege bestimmt. (2) geht in (1) über, wenn $\gamma . K_{O_2}$ verglichen mit K_{CO_2} klein ist.

Praktisch läßt sich dies bei einem nicht zu großen γ durch Verwendung einer großen Flüssigkeitsmenge erreichen. Die größere Löslichkeit der Kohlensäure gegenüber der des Sauerstoffs bewirkt dann, daß von der gebildeten Kohlensäure nur ein geringer Teil in den Gasraum übertritt, und daß die Druckänderung h bloß von der Absorption des Sauerstoffs abhängig ist.

Beispiel:

Es sei $\gamma = -0{,}25$, $\alpha_{CO_2} = 1{,}0$, $\alpha_{O_2} = 0{,}03$, $T = 15^0$, $V_g = 2$, $V_f = 10$.

Dann ist

$$K_{CO_2} = 1{,}19; \quad K_{O_2} = 0{,}22$$

folglich

$$\frac{K_{O_2} . K_{CO_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}} = 0{,}23.$$

Setzen wir aber cet. par.

$$V_g = 10 \quad V_f = 2$$

dann ist

$$K_{CO_2} = 1{,}15; \; K_{O_2} = 0{,}96$$

und

$$\frac{K_{CO_2} . K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}} = 1{,}21!$$

Der Fehler bei den Manometerablesungen betrug nie mehr als 0,5 bis 1,0 mm, im Durchschnitt also 2 Proz. Wenn in Abschnitt V die Resultate bis zu 10 Proz. von den berechneten Werten abweichen, so liegt der Fehler in der Abmessung der eingefüllten Substanzmengen und in der Absorption von CO_2 durch die alkalischen Lösungen.

Als Fehler der Gasanalysen müssen 20 cmm angesetzt werden. Das macht für Sauerstoff je nach der absorbierten Menge 2 bis 10 Proz., für Kohlensäure 4 bis 20 Proz. aus.

Über die Fehler der Bicarbonatbestimmungen siehe Abschnitt VI.

II. Die Photoxydation von Serum und Casein durch Sensibilisatoren.

Den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen bildete folgender Versuch: Von drei Manometergefäßen, die im Thermostaten bei 37° C bewegt wurden, enthielt das eine 3 ccm Pferdeserum, das andere ebensoviel Ringerlösung vom gleichen Bicarbonatgehalt wie das Serum und eine Hämatoporphyrinmenge (Hp.), die $^1/_{1000}$ mol. Hp. entsprach, das dritte Serum von einem Gehalt an Hp., der 10^{-4} mol. war. Die Ver-

suchslösungen standen im Gleichgewicht mit Sauerstoff, der 5 Proz. Kohlensäure enthielt; p_H etwa 7,4. Ich belichtete mit einer 75 Wattlampe in 15 cm Entfernung.

Tabelle I.

37° C. 5 Proz. CO_2—O_2.

Zeit	3 ccm Serum	3 ccm Ringerlösung 10^{-3} mol. Hp.	3 ccm Serum 10^{-4} mol. Hp.
60′	— 5	— 4	— 264 cmm O_2

Man sieht, daß unter Verhältnissen, die bei gewöhnlichem Serum bzw. einer 10^{-3} mol. Hp.-Lösung nur zu geringen Unterdrucken führen, Hp.-haltiges Serum sehr viel Sauerstoff aufnimmt.

Alle weiteren Versuche führte ich in ganz gleicher Weise aus. Nur konnte ich Zimmertemperatur wählen, da kein Grund vorlag, bei 37° zu arbeiten. Die Daten der einzelnen Messungen sind in Abschnitt VI zusammengestellt.

Inzwischen hat *D. T. Harris*[1]), im Anschluß an seine Studien über den Einfluß des Lichtes auf Blut und Plasma, auch die Photoxydation durch Hp. in den Kreis seiner Untersuchungen gezogen und seine Ergebnisse vor kurzem veröffentlicht. Ich werde daher auf den zeitlichen Verlauf dieser Reaktion, den *Harris* genau beschreibt, nicht näher eingehen. *Harris* findet, daß von den im Serum-Eiweiß vorkommenden Aminosäuren nur Tyrosin und Tryptophan oxydiert werden, und daß neben Hp. auch Chlorophyll und Fluoresceinfarbstoffe als Photokatalysatoren in Betracht kommen. Ergebnisse, die ich bestätigen kann und auf die ich nur insoweit zurückkommen werde, als neue Daten mitzuteilen sind.

Gelegentlich seiner Versuche über sensibilisierte Paramäcien und der Adsorption von Farbstoffen an Eiweißkörper äußerte schon *Metzner*, daß dabei an Tyrosin und tyrosinhaltige Proteine zu denken sei. Diese Vermutung hat ihre experimentelle Bestätigung gefunden.

Ebenso wie Hp. verhalten sich auch andere Sensibilisatoren. Ihre Wirkung ist, sofern sie im sichtbaren Licht genügend absorbieren, von gleicher Größenordnung [11][2]). Alle sind sie reine Katalysatoren, d.h. es wird viel mehr Sauerstoff aufgenommen als zu ihrer vollständigen Verbrennung erforderlich wäre, wie folgende Tabelle zeigt:

---

[1]) Biochem. Journ. 20, Nr. 2, S. 280, 1926.

[2]) Die eingeklammerten Ziffern beziehen sich auf die Protokolle in Abschnitt VI.

Tabelle II.

Versuchslösung	Belichtungszeit Stunden	Absorbierte Menge O_2 cmm	Zur Zerstörung der Farbstoffe hinreichende Menge O_2 cmm
4 ccm Serum, 0,22 mg Hp.	4	960	310
4 „ „ 0,22 „ „	17	1270	310
2 „ „ 0,12 „ „	17	760	170
3 „ „ 0,17 „ „	17	1260	235
3 „ „ 0,017 „ „	17	322	24
3 „ „ 0,3 „ R. B.	18	2119	140
5 „ „ 0,13 „ Chl.	0,5	370	205

R. B. = Rose Bengale. Chl. = Äthyl-Chlorophyllid.

Hp. und Chlorophyll zeigen bei Belichtung in neutraler Ringerlösung eine geringe Autoxydation. 5 ccm einer m/1000 Lösung nehmen in der Stunde etwa 4 cmm O_2 auf (11b). Bei Gegenwart von Akzeptor, hier Eiweiß, verläuft diese Autoxydation noch bedeutend langsamer. Die Farbe der Lösungen war oft nach stundenlanger Belichtung unverändert.

(Es sei hier erwähnt, daß zum Arbeiten mit Chlorophyll es völlig genügte, dieses in wenigen Tropfen Methylalkohol zu lösen und dann rasch mit Serum usw. zu vermischen. Hp. wurde meist in der äquivalenten Menge Alkali gelöst hinzugegeben.)

Bei Kontrollversuchen, die ich mit reinem Serum anstellte, ergab sich ein Unterschied, ob diese bei Belichtung oder im Dunkeln ausgeführt wurden. Und zwar nach der Richtung hin, daß auch ohne jeden Zusatz im Lichte ein geringer Sauerstoffverbrauch auftrat (9, 10).

D. T. Harris[1]) hat festgestellt, daß Plasma bzw. Serum bei Bestrahlung mit der Quecksilberlampe Sauerstoff absorbieren. Hier aber konnte es sich nicht um die Wirkung von Violett und Ultraviolett handeln. Besonders da ich bei Versuchen mit anthrachinondisulfosaurem Natrium in Serum und Hühnereiweiß (21) unter den gewöhnlichen Bedingungen keine meßbaren Ausschläge bekam. Dieser sehr wirksame Photokatalysator[2]) ist nur schwach gefärbt und absorbiert im kurzwelligen Ende des Spektrums. Nun ist es wohl sicher, daß in jedem normalen Serum Porphyrine vorkommen[3]). Es war daher anzunehmen, daß diese äußerst geringen Mengen genügten, um die beobachteten Druckänderungen hervorzurufen. Tatsächlich verriet sich selbst der Zusatz von $^1/_{1000}$ mg Hp. auf 2 ccm Serum, d. i. weniger als 10^{-6} mol., durch eine kleine Zunahme der Sauerstoffabsorption (10). Im Laufe

---

[1]) Biochem. Journ. **20**, 38, 1926.
[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **61**, 315, 1914.
[3]) *H. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **182**, 12 und **188**, 337, 1924.

einer Stunde absorbierten 8 ccm normales Pferdeserum, 6 cmm O_2 mit 10^{-6} mol. Hp. aber 8,5 cmm O_2.

Dies bedeutet, daß man auf der Suche nach dem Vorkommen von Porphyrinen, im Serum Kranker z. B., sich in dieser Weise die sensibilisierenden Eigenschaften der Porphyrine zunutze machen kann, denn auch Meso-, Uro- und Koproporphyrin besitzen dieselben photoxydativen Fähigkeiten wie Hp. Je 3 ccm einer 10^{-4} mol. Serumlösung dieser Körper — ich verdanke sie der Freundlichkeit von Herrn Prof. *Hans Fischer* — wurden im üblichen Sauerstoff-Kohlensäuregemisch in 15 cm Abstand dem Lichte einer 60-Wattlampe ausgesetzt (19). Aus Tabelle III ersieht man, daß Uroporphyrin am stärksten sensibilisiert, was mit den Erfahrungen im Tierexperiment übereinstimmt.

Tabelle III.

3 ccm Serum. 5 Proz. CO_2 in O_2. 18° C. 60 Wattlp. 15 cm.

Belichtungszeit Minuten	10^{-4} mol. Mesoporphyrin cmm O_2	10^{-4} mol. Uroporphyrin cmm O_2	10^{-4} mol. Koproporphyrin cmm O_2
10	— 119	— 200	— 98
20	— 233	— 398	— 206
30	— 335	— 530	— 298

In gleicher Weise wie Serum reagierte auch Casein, das in neutralem Puffergemisch gelöst untersucht wurde. Als Puffer kamen Bicarbonat-Kohlensäure oder Phosphatlösung nach *Sörensen* in Anwendung. Eine 1- bis 2proz., sensibilisierte Caseinlösung absorbierte etwa ein Viertel bis ein Drittel derjenigen Menge O_2, welche von Serum unter gleichen Umständen aufgenommen wurde. Es zeigte sich hierbei wieder, daß Farbstoffe wie Hp., Erythrosin und Methylenblau bei derselben molaren Konzentration keine großen Unterschiede in ihrer Wirkung aufwiesen. Je 5 ccm Caseinlösung, die $3 \cdot 10^{-7}$ Mol der genannten Farbstoffe enthielten, absorbierten in 30 Minuten 117, 144 und 120 cmm O_2 (14). Die Photoxydation war von der Zusammensetzung des Puffergemisches nicht sonderlich, merklich aber von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig. Bei zunehmender Alkalität stieg die Menge des in gleichen Zeiten verbrauchten Sauerstoffs (15), s. Tabelle IV.

Tabelle IV.

1 Proz. Casein, 0,5 mol. Phosphat, 10^{-4} mol. Rose Bengale, O_2, 20° C.

Belichtungszeit Minuten	Durch 5 ccm Lösung absorbierter O_2 p_H etwa 7,0 cmm	Durch 5 ccm Lösung absorbierter O_2 p_H etwa 7,7 cmm
15	62	75
30	120	143
60	198	232
120	287	324

Eine meßbare, jedoch gegenüber Serum und Casein sehr geringe Photoxydation zeigten neutrale Lösungen von Nucleinsäure (16).

Vielleicht erlaubt das hier geschilderte Verhalten von Serumeiweiß + sensibilisierendem Farbstoff im Licht auch eine Deutung der optischen Sensibilisation im Lebenden. Der Tod sensibilisierter Tiere bei Bestrahlung wäre dann ganz allgemein die Folge einer Photoxydation, der Zerstörung von Eiweiß, sei es innerhalb der Zelle, sei es im Blutplasma[1]). Es wird so ohne weiteres klar, warum Versuche, eine Desensibilisierung bei Warmblütern durch Einspritzen von Serum usw. zu erreichen, nur negativ verlaufen konnten [*Shibuya, Awoki*[2])]. (Die schützende Wirkung des Serums in den bekannten Versuchen mit Paramäcien beruht dagegen auf der Adsorption der Farbstoffe an die Serumproteine.)

Anders liegt es bei den neuesten Versuchen *Hausmanns*[3]), der sensibilisierte und dem Licht ausgesetzte Mäuse durch Erniedrigung des Sauerstoffdrucks am Leben erhalten kann. Hier wird direkt der Prozeß der Photoxydation des Eiweißes beeinflußt.

III. Die Bildung von Kohlensäure und Ammoniak bei der Photoxydation des Serums usw.

Um die Natur des in den mit Hp.-Serum gefüllten Manometern bei Bestrahlung verschwindenden Gases festzustellen, belichtete ich Serum in einem Rezipienten, der ein bestimmtes Gasgemisch enthielt, das nach dem Versuch wieder analysiert wurde. Als Photokatalysator verwendete ich in der Hauptsache Hp. In jedem Falle war Sauerstoff verbraucht worden, jedesmal hatte sich aber auch die Menge der Kohlensäure im Gasraum vermehrt. Ich stelle hier die Resultate der Versuche (1, 4) zusammen. Die Menge des angewandten Serums betrug 2 bis 4 ccm.

Tabelle V.

	Sensibilisator und Konzentration	Belichtungszeit Stunden	Absorbierter O_2 cmm	Abgegebene CO_2 cmm	Verhältnis von Kohlensäure / Sauerstoff (γ)
1.	Hp. etwa 10^{-4} mol.	4	960	255	0,26
2.	„ „ 10^{-4} mol.	17	1270	280	0,22
3.	„ „ 10^{-3} mol.	1	980	231	0,24
4.	„ „ 10^{-4} mol.	17	760	220	0,29
5.	„ „ 10^{-4} mol.	17	1260	333	0,26
6.	„ „ 10^{-5} mol.	17	322	80	0,25
	R.B.*) „ 10^{-4} mol.	18	2119	519	0,24
				Im Mittel γ:	0,25

*) R. B. = Rose Bengale.

[1]) *Harris* nimmt eine Spaltung der Sensibilisatoren in toxische Produkte an. Proc. Chem. Soc. Ser. B. 98, 171, 1925.

[2]) Strahlentherapie 18, 710; diese Zeitschr. 158, 337, 1925.

[3]) Diese Zeitschr. 178, 7, 1926.

Das Ergebnis war also, daß auf vier Moleküle absorbierten Sauerstoffs ein Molekül Kohlensäure kam. Diese Kohlensäure konnte nun zweierlei Ursprungs sein. Sie war entweder aus den oxydierten Proteinen direkt abgespalten oder aus dem Bicarbonat des Serums durch Säurebildung ausgetrieben worden. Bestimmungen des Gehalts an Bicarbonat, die ich vor und nach jedem Versuch anstellte, ergaben, daß die Bicarbonatmenge der Versuchslösung stets abgenommen hatte. Die gasanalytisch gemessene Kohlensäure stammte danach zum größeren Teile aus dem Bicarbonat des Serums. Jedoch war in allen Fällen, außer einem, eine Differenz zwischen den Werten der Gasanalyse und denen der Bicarbonatbestimmungen vorhanden, und zwar in dem Sinne, daß Kohlensäure auch direkt durch Oxydation entstanden sein mußte (2, 5).

Die Zahlen schwanken erheblich. Sie sind mit den Fehlern der Gasanalyse und der Bicarbonatbestimmung belastet, die hier einen hohen Prozentsatz ausmachen, und beweisen daher nur die Bildung von CO_2, ohne über das Verhältnis O_2/CO_2 Genaues auszusagen.

Tabelle VI.

	Gesamt-Kohlensäure (aus Tabelle V)	Durch Säurebildung aus dem Bicarbonat ausgetriebene Kohlensäure	Differenz = oxydativ gebildete Kohlensäure
	cmm	cmm	cmm
1.	255	145	+ 110
2.	280	150	+ 130
3.	231	235	— 4
4.	220	200	+ 20
5.	333	270	+ 63
6.	80	51	+ 29
	519	366	+ 153

Kontrollversuche führte ich sowohl mit Hp.-haltigem als auch mit reinem Serum aus. Die Behandlung war die gleiche wie bei den eben besprochenen, nur daß sie unter Lichtabschluß erfolgte. Eine Sauerstoffabsorption oder Kohlensäurebildung war nach einer Versuchsdauer von 18 bis 20 Stunden nicht zu erkennen (6, 7).

Dagegen gaben Pferde- oder frisches Rattenserum, in der gleichen Anordnung belichtet, ein wenn auch nahe der Fehlergrenze liegendes Resultat. Immer war eine kleine Menge Sauerstoff verbraucht worden, was mit den im vorigen Abschnitt beschriebenen Manometerversuchen im Einklang stand (8).

Prüfte ich Serum, das in Gegenwart von Sensibilisatoren (Hp.) belichtet worden war, auf seinen Ammoniakgehalt, so ergab sich, daß größere Mengen NH_3 entstanden waren. Diese ließen sich nach *Folin* kolorimetrisch bestimmen und standen, wie ich fand, zu dem bei der Photoxydation verschwundenen Sauerstoff in einem konstanten Ver-

hältnis. Auf sieben Moleküle O_2 kam ein Molekül abgespaltenes NH_3 (3), Tabelle VII. Ein Umstand, der wieder die Ähnlichkeit der photodynamischen Erscheinung *Tappeiners* mit einer (Eiweiß-) Verbrennung erkennen läßt.

Tabelle VII.

Absorbierter Sauerstoff Mol.	Gebildetes Ammoniak Mol.	Verhältnis NH_3/O_2
$4,28 \cdot 10^{-5}$	$0,68 \cdot 10^{-5}$	1/6,4
5,67	0,72	1/7,9
4,36	0,64	1/6,8
9,03	1,36	1/6,6
	Mittel:	1/6,9

Die Photoxydation des Caseins entsprach in allem der des Serums. 3 ccm einer 1 proz. Lösung in Bicarbonat-Kohlensäurepuffer wurden mit 0,56 mg Hp. 18 Stunden wie gewöhnlich belichtet. Verbraucht wurden 300 cmm O_2, abgegeben 70 cmm CO_2. Demnach $\gamma = 0,23$, d. h. das Verhältnis entstandene Kohlensäure zu absorbiertem Sauerstoff war das gleiche, wie bei der Verbrennung der Serumproteine. Ähnlich stand es mit der Ammoniakbildung. Auf 10 Moleküle O_2 kam 1 Molekül NH_3. Die Bildung von Oxydationskohlensäure war bei Casein insofern leichter nachzuweisen, als dazu nur nötig war, statt des Bicarbonat-Kohlensäuregemisches Phosphatpuffer anzuwenden. Wenn dann nach dem Versuch in der Lösung mehr CO_2 vorhanden war als vorher, so konnte diese Kohlensäure nur aus den oxydierten Proteinen stammen. Zwei Versuche seien hier wiedergegeben (12, 13).

Tabelle VIII.

1 Proz. Casein, ½ mol. Phosphat: p_H etwa 7,7, Gasraum: Luft. Temperatur 18°.

Versuchslösung	Belichtungszeit Stunden	Absorbierter O_2 cmm	CO_2 vorher cmm	CO_2 nachher cmm	Oxydationskohlensäure cmm
0,28 mg Hp. in 5 ccm	20	480	159	245	86
1,0 mg R. B. in 5 ccm	16	560	159	208	49

75 Watt 15 cm.

IV. Verhalten der Metallverbindungen des Hämatoporphyrins. Die Bindung der Farbstoffe an Eiweiß. Versuche bei Zusatz von Gallensäuren. Einfluß von Sauerstoffdruck und Temperatur.

Bekanntlich sensibilisiert Hämin im Gegensatz zu Hp. nicht. Wie zu erwarten, ließ sich mit Hämin auch keine photoxydative Wirkung erzielen.

Angeregt durch die Arbeiten von *Th. van der Bom*[1]) und von *Ch. Dhéré* über die Fluoreszenz des Hp. und seiner Metallverbindungen, verglich ich einige zu dem Zweck dargestellte Salze des Hp. mit dem natürlichen Hämin. Sie wurden in einer Lösung von frischem Hühnereiweiß belichtet. Tabelle IX zeigt die in gleichen Zeiten absorbierten Kubikmillimeter O_2. Die Manometer enthielten je 2 ccm Lösung, im Gasraum Luft (22).

Tabelle IX.

Stoff:	Hämin	Hp.-Kupfersalz	Hp.-Zinksalz	Hp.-Silbersalz	Hp. rein zum Vergleich
Konzentration:	10^{-4} mol.	10^{-4} mol.	10^{-4} mol.	$2 \cdot 10^{-4}$ mol.	10^{-4} mol.
10′	—1	0	—117	0	—113
20′	0	—1	—215	0	—208

Die Schwermetallsalze (Cu, Ag) verhalten sich also wie Hämin. Das Zinksalz jedoch unterscheidet sich hier durch nichts vom gewöhnlichen Hp. Es besteht aber noch eine weitere Ähnlichkeit zwischen den photoxydativ wirksamen Körpern einerseits und andererseits den nicht sensibilisierenden. Das Zinksalz hat die Fähigkeit, wie Hp. zu fluoreszieren, während die Einführung von Cu oder Ag in das Hp.-Molekül dessen Fluoreszenz vernichtet.

Fluoreszenz und Photoxydation laufen demnach parallel. Kürzlich hat nun *Noack*[2]) das gleiche für die Chlorophyllfarbstoffe dargetan. Eine Benzidinlösung, die durch Chlorophyll im Lichte gebräunt wird, bleibt in Gegenwart von nicht fluoreszierendem Kupfer-Chlorophyll unverändert. Die seit der Entdeckung der photodynamischen Erscheinung immer wieder vermutete Gemeinschaft von Fluoreszenz und Sensibilisation kann also als bewiesen gelten. Dies heißt aber vorläufig nichts weiter, als daß (im Gegensatz zum häufigsten Falle der Umwandlung in Wärme) Moleküle, welche die absorbierte Lichtenergie in Form von Fluoreszenzstrahlung abgeben können, auch stets imstande sind, ihre Energie chemisch wirksam werden zu lassen.

Noack berichtet über eine beschleunigende Wirkung des Mangans (und anderer Metalle) bei der Oxydation des Benzidins durch Eosin im Lichte. Bei der Photoxydation des Serums durch Hp. war Mn ohne jeden Einfluß. Es müssen also Unterschiede vorhanden sein zwischen der oxydativen Farbstoffbildung in *Noacks* Benzidinversuchen und der Photoxydation von Proteinen in den hier beschriebenen. Jeden-

---

[1]) Fluorecence de l'Hématoporphyrine. Fribourg. Imp. de l'Oeuvre St. Paul 1924.

[2]) Naturwiss. 14, 385, 1926.

falls nimmt eine Benzidinlösung Sauerstoff ungleich viel langsamer auf als etwa Serum unter den gleichen Bedingungen.

P. Metzner hat 1924[1]) an Paramäcien nachgewiesen, daß nur der an Eiweiß gebundene Farbstoff sensibilisierend wirkt. Demnach mußte für die Photoxydation das gleiche zutreffen, was ich auch bestätigt fand. Ich filtrierte Serum durch ein Ultrafilter nach *Bechhold*. Das Ultrafiltrat gab beim Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure keine Trübung oder Opaleszenz. Wurde nun die Sauerstoffabsorption von Serum verglichen mit der des Ultrafiltrats bei gleicher Belichtung und gleicher Konzentration an Hp., so ergab sich folgendes: 3 ccm Serum absorbierten in 30 Minuten 480 cmm O_2; 3 ccm Serumultrafiltrat in derselben Zeit 25 cmm. Und in einem anderen Versuch verbrauchten 2 ccm Ultrafiltrat in 20 Minuten 15 cmm O_2, während die gleiche Menge Filtrat, das mit dem Filterrückstand wieder vereinigt worden war, 395 cmm aufnahm (20). Es sind also die Kolloide des Serums, die zerstört werden, und diese haben die Eigenschaft, Farbstoffe, wie Eosin, Erythrosin, Hp., sehr stark zu adsorbieren. *G. Busck*[2]) hat in Dialysierversuchen festgestellt, daß m/1000 Eosin-Eiweiß- bzw. Eosin-Serumlösungen an die 1,5fache Menge Wasser nur so viel Farbstoff abgeben, daß eine m/40000 bis m/300000 Lösung entsteht.

Wenn ich m/1000 Erythrosin in Serum durch ein Ultrafilter sog, so war die Konzentration im Filtrat nur noch m/30000. (Filter und Filtertiegel wurden vorher mit m/1000 Erythrosin in Wasser durchspült, um die Adsorption von Farbstoff aus dem Serumfiltrat an das Filter usw. zu verhindern.) Ebenso verhielt sich Hp. in Serum- und Eiweißlösungen. Immer war im Ultrafiltrat bloß $^1/_{20}$ bis höchstens $^1/_{10}$ der zugesetzten Hp.-Menge zu finden (kolorimetrisch gemessen).

Mit den eben erwähnten Adsorptionsverhältnissen hängt wohl eine Wirkung der gallensauren Salze zusammen, die ich zu beobachten Gelegenheit hatte. Fel tauri (dep. sicc. *Merck*) zu Erythrosin-Eiweiß zugesetzt, beschleunigte die Photoxydation erheblich (23a, I). Dabei war zu beachten, daß sowohl Eiweiß + Gallensäure wie auch Gallensäure + Erythrosin bei Belichtung Sauerstoff verbrauchten. Diese Ausschläge wurden der gewöhnlichen Photoxydation von Eiweiß + Erythrosin zugezählt. Dennoch betrug die O_2-Absorption des Systems Eiweiß + Erythrosin + Gallensäure das Doppelte jener Summe.

Der nächste Versuch zeigte, daß ganz wenig Gallensäure genügte, um eine Beschleunigung hervorzubringen, die durch starke Erhöhung

[1]) Diese Zeitschr. 148, 498, 1924.
[2]) Ebendaselbst 1, 415, 1908.

der zugesetzten Menge nur unwesentlich vergrößert wurde (23a, II). Wir multiplizieren mit der einfachen Gefäßkonstanten für Sauerstoff — es kommt ja nur auf das Verhältnis der Ausschläge zueinander an — und stellen die Zahlen in Tabelle X zusammen.

Tabelle X.
2 ccm Eiweiß in Luft. 60 Watt. 20 cm.

Zeit	0,12 g Hp.	0,12 mg Hp. 1,0 mg Fel tauri	0,12 mg Hp. 25,0 mg Fel tauri
20′	— 160 cmm O_2	— 300 cmm O_2	— 321 cmm O_2
40	— 304 „ O_2	— 534 „ O_2	— 590 „ O_2

Taurocholsaures Natrium, das den Vorteil hatte, nur geringe Nebenreaktionen zu geben, erhöhte in einer Menge von 20 mg den Sauerstoffverbrauch einer halbverdünnten, mit Erythrosin sensibilisierten Eiweißlösung (4 ccm) von 163 auf 238 cmm, bei einer Belichtungszeit von 20 Minuten (23b).

Merkwürdigerweise war in Serum im Gegensatz zu Eiweiß mit Taurocholsäure keine Beschleunigung der Photoxydation zu erzielen (23c)[1]).

Ein Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks ist bei allen hier behandelten Reaktionen festzustellen, wenngleich die Oxydationsgeschwindigkeit Änderungen des Druckes nur langsam folgt. Erniedrigte ich z. B. (17) den Sauerstoffgehalt im Gasraum von 100 auf 20 Proz., so sank die in gleichen Zeiten usw. absorbierte Menge O_2 von 245 auf 169 cmm, d. h. um ein Drittel. Bei 6 Proz. O_2 wurden noch 89 cmm absorbiert. Im ganzen bewirkte eine Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks auf den 17. Teil nur eine Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs auf ein Drittel des ursprünglichen Wertes.

Temperatursteigerungen brachten bei der Photoxydation von Eiweiß, wie bei den meisten lichtchemischen Reaktionen, nur eine geringe Beschleunigung hervor (18). Eine Erhöhung der Temperatur um 25° C etwa, äußerte sich in einer nur um ein Viertel größeren Sauerstoffabsorption, s. Tabelle XI.

Tabelle XI.
Je 3 ccm Eiweiß in Luft. 10^{-4} mol. Hp. 15 Minuten bel.
Zweimal 60 Watt. 20 cm.

Temperatur:	4,6°	8,0°	13,4°	19,5°	25,8°	31,0°
Abs. O_2 in cmm:	— 213	— 221	— 238	— 265	— 274	— 274

[1]) *Sandford M. Rosenthal* gibt an, daß an Eiweiß adsorbierter Farbstoff sich nach Zusatz von Taurocholsäure zum Teil ausdialysieren lasse (Chem. Centralbl. **1925**, II, 2067).

V. Die Photoxydation von Tyrosin, Phenol und Harnsäure in alkalischer Lösung.

Das Auffallendste bei der Lichtoxydation des Tyrosins durch Sensibilisatoren war die große Beschleunigung der Oxydation, die eintrat, wenn ein Äquivalent Natriumhydroxyd hinzugefügt wurde. Abb. 3 gibt ein Bild der O_2-Absorption von 10 ccm 0,2proz. freien Tyrosins (Lösung übersättigt) und von 10 ccm 0,2proz. Tyrosin-Natrium mit je 5 mg Hp. Letztere Lösung hatte ein p_H von 9,4 (kolorimetrisch nach *Sörensen*). Weiterer Zusatz von Alkali beschleunigte nur unwesentlich mehr. Dagegen stieg in alkalischer Lösung die Autoxydation der Farbstoffe rasch an und mußte daher immer beachtet, d. h. in Abzug gebracht werden.

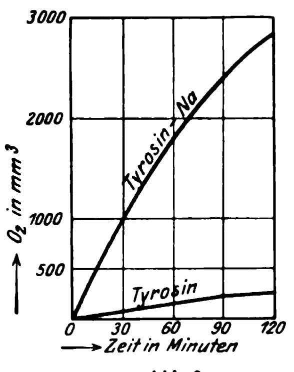


Abb. 3. Photoxydation des Tyrosins als freie Säure und als Natriumsalz.

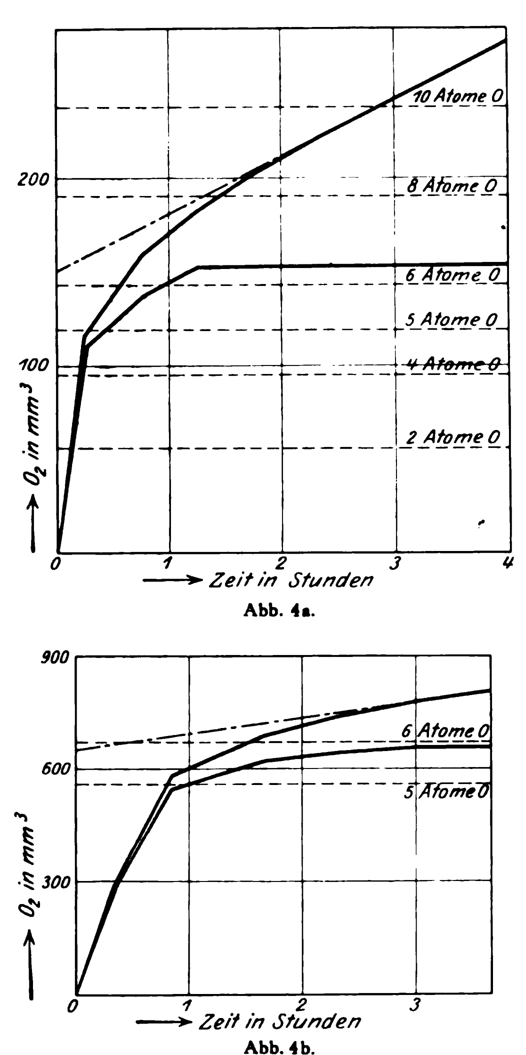
Bei der Photoxydation des Tyrosinnatriums entstand Kohlensäure, wie sich aus der erheblichen Differenz im CO_2-Gehalt einer sensibilisierten und einer farbstofffreien Lösung ergab. 3 ccm einer $0,9 \cdot 10^{-2}$ mol. Tyrosinlösung in n/10 NaOH wurden mit 2 mg Hp. und 3 mg Rose Bengale mehrere Stunden belichtet. Nach 410 Minuten wurde der Versuch abgebrochen. 2757 cmm O_2 waren absorbiert, 903 cmm CO_2 gebildet worden (24). Das Verhältnis CO_2/O_2 hatte den Wert $^1/_3$. Weiterhin bewies der Versuch, daß ein Molekül Tyrosin unter diesen Bedingungen mehr als $4^1/_2$ Moleküle Sauerstoff aufnahm.

Das besondere Verhalten des Tyrosins gegenüber Oxydationsmitteln führt man bekanntlich auf die Anwesenheit der Oxyphenylgruppe zurück. Ich erwartete daher, daß Phenol in der gleichen Weise wie Tyrosin durch Sensibilisatoren sich leicht würde oxydieren lassen. In schwach alkalischer Lösung war dies auch der Fall. Die Oxydationsgeschwindigkeit war dabei anfangs recht groß, um dann abzufallen und schließlich konstant zu werden. Diese gleichmäßig verlaufende Sauerstoffabsorption, die immer nach einer gewissen Zeit auftrat, wurde, wie ich an Hand von Kontrollen feststellen konnte, durch die Autoxydation des Farbstoffs verursacht. Ich stellte nun Versuche an, in denen eine kleine Menge Akzeptor durch einen Überschuß an Sensibilisator möglichst rasch oxydiert werden sollte. Nach Abzug der Autoxydationsgröße des Farbstoffs (Hp.) mußte sich dann ergeben, wieviel Sauerstoff von einem Molekül Akzeptor — hier Phenol — insgesamt aufgenommen worden war (25). Die Ergebnisse zeigen,

daß mit weniger als 1 mg Substanz ausreichende Genauigkeit zu erlangen war.

0,21 mg C_6H_6O absorbierten 153 cmm O_2, berechnet für 3 Moleküle O_2: 143 cmm.

0,94 mg $C\ H_6O$ absorbierten 656 cmm O_2, berechnet für 3 Moleküle O_2: 672 cmm.



Photoxydation des Phenols. Obere Kurve gemessen, untere Kurve korrigiert.

In Abb. 4a und b sind die beiden Versuche dargestellt. Die obere Kurve gibt jedesmal den wirklich gemessenen Verlauf der Photoxydation

wieder. Sie geht zuletzt in eine Gerade über: die Autoxydation des Hp. Die Verlängerung dieser Geraden bezeichnet auf der Ordinate den maximalen Sauerstoffverbrauch des Phenols. Es sind, wie man sieht, 6 Atome oder 3 Moleküle Sauerstoff. Die untere Kurve stellt die Photoxydation des Phenols dar, ohne die übergelagerte Autoxydation des Sensibilisators. Deutlich ist, wie zuerst mit beinahe konstanter Geschwindigkeit 5 Atome O_2 aufgenommen werden, ein sechstes folgt, doch bedeutend langsamer. Dann ist die Reaktion beendet.

L. Pincussen hat schon im Jahre 1913 entdeckt, daß harnsaure Salze durch fluoreszierende Farbstoffe, wie Eosin usw., im Lichte verändert und zerstört werden[1]). Es ist eine Oxydation der Harnsäure, die sehr rasch verläuft. Zu meinen Versuchen löste ich Harnsäure in zwei Äquivalenten Natriumhydroxyd auf. Weniger Alkali war ungünstig, mehr ohne weitere Wirkung. 3 ccm einer m/100 Lösung absorbierten mit 1 mg Hp. sensibilisiert in 15 Minuten 190 cmm O_2, während die gleiche Lösung, ohne Farbstoff belichtet, nicht die geringste Druckänderung gab. Kaffein wurde sechsmal langsamer oxydiert, Alloxan überhaupt nicht angegriffen.

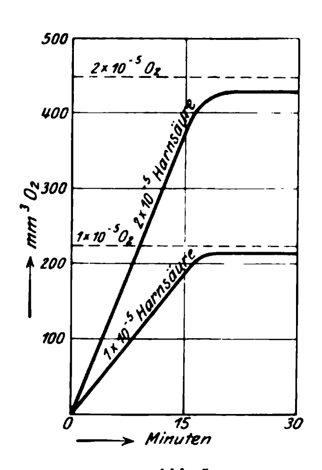


Abb. 5. Photoxydation der Harnsäure in alkalischer Lösung.

Anders als bei Phenol und Tyrosin ist die Photoxydation der Harnsäure schon mit der Aufnahme eines Moleküls Sauerstoff beendet. Gleichzeitig wird ein Molekül Kohlensäure abgespalten (26).

Es absorbierten:

1. 1,68 mg Harnsäure ($1 \cdot 10^{-5}$ mol.) 214 cmm O_2. Ber.: 224 cmm
2. 3,36 „ „ ($2 \cdot 10^{-5}$ mol.) 428 „ O_2. Ber.: 448 „

Für 1,68 mg Harnsäure ber.: 224 cmm CO_2,
gef.: 245 und 226 cmm CO_2.

Als Sauerstoffüberträger diente diesmal Rose Bengale, dessen Autoxydation, wie aus Abb. 5 ersichtlich, bei der kurzen Versuchsdauer keine Rolle spielte.

VI. Protokolle.

1. Gaswechsel von Serum, das Sensibilisatoren enthält, bestrahlt.

Benutzt wurde leicht gelb gefärbtes inaktiviertes Pferdeserum. Die Temperatur, bei der das Gasgemisch im Rezipienten mit der flüssigen Phase im Gleichgewicht war und bei der das Gas in den Analysenapparat

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 22.

übergeführt wurde, betrug immer 18° C. Belichtet wurde mit einer 75-Watt-lampe in 15 cm Entfernung. In der Tabelle bedeutet: t die Versuchsdauer (Bestrahlungszeit), V_f das Flüssigkeitsvolumen im Rezipienten, V_g das Gasvolumen im Rezipienten, Proz. I die Zusammensetzung des Gases, mit welchem das Serum vor dem Versuch bei 18° gesättigt war, Proz. II die Zusammensetzung des Gases, mit dem das Serum nach den Versuchen bei 18° im Gleichgewicht war, p den Barometerstand in Millimeter Hg, G_v das im Analysenapparat vorhandene Stickstoffvolumen, G_n das Volumen nach dem Einsaugen des zu analysierenden Gasgemisches, G_e die eingeführte Gasmenge, n. Kalil. das Gasvolumen nach der Absorption in Kalilauge, n. Hydros. dasselbe nach Absorption durch Hydrosulfitlösung. Fehler der Analysen ± 20 cmm.

a) Belichtung mit Hämatoporphyrin (Hp.), angegeben in mg gelöst in V_f.

Protokoll 1.

Hämatoporphyrin in Serum belichtet. Temperatur = 18° C.

Nr.	mg Hp. gel. in V_f	t Stunden	V_f cmm	V_g cmm	Proz. I CO_2	Proz. I O_2	Proz. I N_2	p mm Hg
1	0,22	4	4,0	6,93	4,6	19,8	75,6	757
2	0,22	17	4,0	7,08	4,6	19,8	75,6	751
3	2,24	1	4,0	7,08	4,6	19,8	75,6	760,5
4	0,12	17	2,0	9,08	4,6	19,8	75,6	753
5	0,17	17	3,0	8,08	4,6	19,8	75,6	753
6	0,017	17	3,0	8,08	4,6	19,8	75,6	758

Nr.	G_n cmm	G_v cmm	G_e cmm	Abs. n. Kalil. cmm	Abs. n. Hydros. cmm	Proz. II CO_2	Proz. II O_2	Proz. II N_2	X_{O_2} cmm	X_{CO_2} cmm
1	11,575	5,685	5,890	11,095	10,760	8,15	5,70	86,15	960	255
2	10,185	4,885	5,300	9,715	9,685	8,88	0,57	90,55	1270	280
3	11,060	5,205	5,855	10,600	10,260	7,85	5,80	86,35	980	231
4	12,285	4,260	8,025	11,700	10,780	7,30	11,45	81,25	760	220
5	11,260	4,705	6,555	10,660	10,440	9,15	3,36	87,49	1260	333
6	10,310	3,060	7,250	9,905	8,740	5,58	16,08	78,34	322	80

b) Bicarbonatgehalt des Serums vor und nach der Bestrahlung.

Es wurde etwa 1 ccm des betreffenden Serums rasch in einem sogenannten Ansäuerungsgefäß abgewogen, mit der passenden Gasmischung im Thermostaten ins Gleichgewicht gebracht und durch Einkippen von überschüssiger Säure die Kohlensäure ausgetrieben. Das frische Serum wurde mit dem gleichen Gasgemisch behandelt wie im Analysenrezipienten. Für das belichtete Serum hätte ein Gas mit gleichem CO_2-Partialdruck, wie er durch die Werte der Gasanalyse nach der Bestrahlung gegeben war, Verwendung finden müssen. Eine Bedingung, die nur unvollkommen erfüllt werden konnte und daher eine Fehlerquelle der Bestimmung bildete. Die manometrische Messung ist, wie die Doppelbestimmungen bei 1 und 5 zeigen, auf 1 Proz. genau. Es genügt aber eine Verschiebung des CO_2-Partialdrucks von 7 auf 10 Proz. z. B., um den Fehler zu verdreifachen. Die gasanalytisch gewonnenen Werte für die gesamte während des Oxydations-

Protokoll 2.

	1				2		3		4		5				6	
	Vorher		Nachher		Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher		Nachher		Vorher	Nachher
V_f . . . . cmm	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
V_g . . . . cmm	19,0	19,13	19,0	19,13	19,13	19,0	19,13	19,13	19,13	19,13	19,0	19,13	19,0	19,13	19,0	19,13
Temperatur . . . . °C	18	18	19	19	18	18	18	18	18	18	19	19	19	19	19	19
K_{CO_2}	1,88	1,89	1,87	1,88	1,89	1,88	1,89	1,89	1,89	1,89	1,87	1,88	1,87	1,88	1,87	1,88
Eingewogene Menge Serum . . . . . g	0,8140	0,8156	0,8057	0,7990	0,8100	0,8183	0,8163	0,8152	0,8231	0,8102	0,8318	0,8121	0,8190	0,8186	0,8177	0,8140
CO_2 im Gas des Rezipienten . Proz.	4,6	4,6	8,15	8,15	4,6	8,88	4,6	7,85	4,6	7,3	4,6	4,6	9,15	9,15	4,6	5,58
CO_2 im Gas des Manometers . Proz.	4,6	4,6	4,6 (!)	4,6	4,6	10,8	4,6	4,6	4,6	5,8	4,6	4,6	7,2	10,8	4,6	5,8
Manometerausschlag . . mm	+250	+249	+233	+229	+251	+241	+256	+231	+265	+218	+271	+264	+225	+230	+268	258
„ . cmm	468	471	435	431	475	450	+484	437	501	+412	507	496	421	432	501	485
ccm berechnet auf die Menge Serum im Rezipienten . .	2300	2310	2160	2160	2350	2200	2375	2140	1218	1018	1830	1834	1542	1587	1839	1788
Differenz, d. i. die während der Oxydation ausgetriebene Menge CO_2 . . . . . cmm	D_{CO_2} = 140—150				150		235		200		243—292				51	
$X_{CO_2} - D_{CO_2}$, d. h. bei der Oxydation entstandene freie Kohlensäure	110				130		(— 4)		20		41—90				29	

prozesses in den Gasraum gegangene Kohlensäure haben eine Ungenauigkeit von 8 bis 10 Proz. Die in der letzten Rubrik des Protokolls 2 enthaltenen Zahlen — $X_{CO_2} - D_{CO_2}$ (D_{CO_2} gleich Bicarbonat vorher minus Bicarbonat nachher) — können daher nur beweisen, daß freie Kohlensäure entsteht, deren absolute Menge jedoch unbestimmt bleibt.

c) Bestimmung des abgespaltenen Ammoniaks.

Protokoll 3.

NH_3 wurde nach *Folin* in verdünnte Säure übergetrieben und mittels *Nesslers* Reagens kolorimetrisch bestimmt.

Vergleichslösung: n/500 NH_4Cl.

Nr.	Absorbierte Menge O_2		Gebildete Menge NH_2		NH_3/O_2
	cmm	Mol	cmm n/500	Mol	
1	960	$4{,}28 \cdot 10^{-5}$	3,4	$0{,}68 \cdot 10^{-5}$	1/6,4
2	1270	5,67	3,6	0,72	1/7,9
3	980	4,36	3,2	0,64	1/6,8
(4)	2020	9,03	6,8	1,36	1/6,6

d) Serum mit Rose Bengale.

Protokoll 4.

Gasanalyse. Temperatur = 18° C.

Gelöst in V_f	t	V_f	V_g	Proz. I			p	G_n	G_v
mg	Stunden	ccm	ccm	CO_2	O_2	N_2	mm Hg	ccm	ccm
0,3	18	3,0	9,20	4,6	67,0	28,4	765	12,540	5,600

G_e	n. Kalil.	n. Hydros.	Proz. II			X_{O_2}	X_{CO_2}	$\frac{X_{CO_2}}{X_{O_2}}$
ccm			CO_2	O_2	N_2	cmm	cmm	
6,940	11,74	8,06	11,5	53,0	35,5	2119	519	0,245

Protokoll 5.

Bicarbonatbestimmung. Temperatur = 20° C.

	Vorher	Nachher
V_f	1,0	1,0
V_g	19,13	19,13
K_{CO_2}	1,86	1,86
Eingewogene Menge Serum . . . . g	0,6174	0,8198
CO_2 im Gas des Rezipienten . . . . Proz.	4,6	11,5
CO_2 im Gas des Manometers . . . . Proz.	4,6	10,8
Manometerausschlag . . . . mm	+ 176	+ 180
" . . . cmm	328	335
CO_2 berechnet für die Menge Serum im Rezipienten . cmm	1593	1227
Differenz D_{CO_2} . . . . . . cmm	366	
$X_{CO_2} - D_{CO_2}$ . . . . . . cmm	153	

Protokoll 6.

Serum und Hämatophorphyrin im Dunkeln. In gleicher Weise ausgeführt, wie die Lichtversuche.

Gasanalyse. Temperatur = 18° C.

Nr.	Hp. in V_f mg	t Stunden	V_f ccm	V_g ccm	Proz. I CO_2	Proz. I O_2	Proz. I N_2	p mm Hg	G_n	G_v
1	0,17	18	3,0	12,73	4,6	19,8	75,6	749	14,82	2,99
2	0,56	20	3,0	12,73	4,6	19,8	75,6	760	14,60	2,86

Nr.	G_e	n. Kalil.	n. Hydros.	Proz. II CO_2	Proz. II O_2	Proz. II N_2	X_{O_2} cmm	X_{CO_2} cmm	Größe des Fehlers cmm
1	11,83	14,26	11,94	4,7	19,6	75,7	23	11	20
2	11,74	14,06	11,75	4,6	19,7	75,7	20	0	20

Protokoll 7.

Reines Serum im Dunkeln.

Gasanalyse. Temperatur = 18° C.

Art des Serums	t Stunden	V_f	V_g	Proz. I CO_2	Proz. I O_2	Proz. I N_2	p	G_n	G_v
Pferdeserum	18	3,0	8,08	4,6	19,8	75,6	759	11,25	3,48
Rattenserum	18	3,0	12,73	4,6	19,8	75,6	760	16,80	4,32

Art des Serums	G_e	n. Kalil.	n. Hydros.	Proz. II CO_2	Proz. II O_2	Proz. II N_2	X_{O_2}	X_{CO_2}
Pferdeserum	7,77	10,89	9,34	4,7	19,7	75,6	4	9
Rattenserum	12,48	16,25	13,74	4,8	19,7	75,5	12	24

Protokoll 8.

Serum, ohne Zusatz belichtet.

Gasanalyse. Temperatur = 18° C.

Art des Serums	t Stunden	V_f	V_g	Proz. I CO_2	Proz. I O_2	Proz. I N_2	p	G_n	G_v
Pferdeserum	17	4,0	7,08	4,6	19,8	75,6	761	10,46	3,86
Rattenserum (frisch)	24	3,0	8,08	4,6	19,8	75,6	762	11,48	3,72
	17	3,0	8,08	4,6	19,8	75,6	759	11,50	3,70

Art des Serums	G_e	n. Kalil.	n. Hydros.	Proz. II CO_2	Proz. II O_2	Proz. II N_2	X_{O_2}	X_{CO_2}
Pferdeserum	6,60	10,14	8,88	4,85	19,1	76,05	53	22
Rattenserum (frisch)	7,76	11,10	9,60	4,90	19,3	75,80	42	30
	7,80	11,12	9,61	4,85	19,4	75,75	33	25

Protokoll 9.

Reines Serum belichtet und unbelichtet (manometrisch).
Temperatur = 19,6 ± 0,05°.

Bestrahlt wurde mit 75-Watt-Lampe in 15 ccm Abstand. Ausgleichszeit im Thermostaten vor dem Versuch etwa 30 bis 45'.

a)			b)		
Zeit	Belichtet 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 8 V_g 6,1 K_{O_2} 0,60 K_{CO_2} 1,27	Dunkel 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 8 V_g 5,9 K_{O_2} 0,58 K_{CO_2} 1,25	Zeit	Belichtet 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 8 V_g 6,1 K_{O_2} 0,60 K_{CO_2} 1,27	Dunkel 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 8 V_g 5,9 K_{O_2} 0,58 K_{CO_2} 1,25
120'	— 15	+ 1	60'	— 10	+ 0,5
180	— 25	0	180	— 32	0

D. h. a) 60': — 5 cmm O_2 b) 60': — 6 cmm O_2
15': — 1,25 ccm O_2 15': — 1,5 ccm O_2

Protokoll 10.

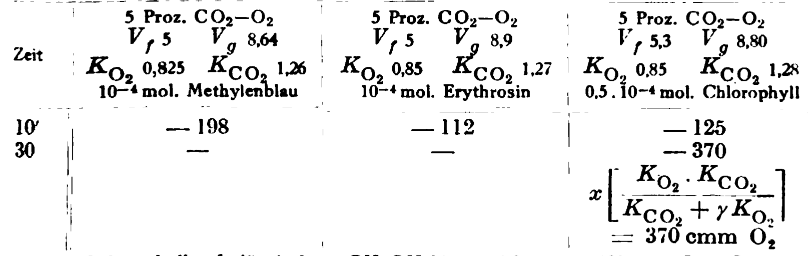
Serum und 10^{-6} mol. Hämatoporphyrin (manometrisch).
Temperatur 18° C.
Belichtet wie 9.

Zeit	Belichtet 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 8 V_g 5,39 K_{O_2} 0,53 K_{CO_2} 1,24 $4 \cdot 10^{-3}$ mg Hp.	Dunkel 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 8 V_g 5,51 K_{O_2} 0,54 K_{CO_2} 1,26 $4 \cdot 10^{-3}$ mg Hp.
15'	— 3,5	+ 0,5
30	— 7,0	+ 0,5

D. h. 60': — 7,4 cmm O_2.
15': — 1,86 „ O_2.

Protokoll 11a.

Serum und fluoreszierende Farbstoffe.
Temperatur = 20,0°.
Belichtet wie 9 und 10.



Zeit	5 Proz. CO_2—O_2 V_f 5 V_g 8,64 K_{O_2} 0,825 K_{CO_2} 1,26 10^{-4} mol. Methylenblau	5 Proz. CO_2—O_2 V_f 5 V_g 8,9 K_{O_2} 0,85 K_{CO_2} 1,27 10^{-4} mol. Erythrosin	5 Proz. CO_2—O_2 V_f 5,3 V_g 8,80 K_{O_2} 0,85 K_{CO_2} 1,28 $0,5 \cdot 10^{-4}$ mol. Chlorophyll
10'	— 198	— 112	— 125
30	—	—	— 370
			$x\left[\frac{K_{O_2} \cdot K_{CO_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}}\right]$ = 370 cmm O_2

0,88 g Chlorophyll aufgelöst in 2 ccm CH_3OH, hiervon 0,3 ccm = 0,132 mg zu 5 ccm Serum.

Protokoll 11b. Autoxydation belichteter Sensibilisatoren.

75-Watt-Lampe. 15 cm Abstand.

Zeit	$T = 37^0$ p_H etwa 7,4 $T = 20^0$		$T = 20^0$ p_H etwa 7,7 $T = 20^0$	
	5 Proz. CO_2—O_2 V_f 3 V_g 11,1 K_{O_2} 1 K_{CO_2} 1,7 1,68 mg Hp. ∽ n/1000 in Ringer, 2,5 10^{-2} mol. $NaHCO_3$	5 Proz. CO_2—O_2 V_f 5,7 V_g 8,4 K_{O_2} 0,81 K_{CO_2} 1,29 0,95 mg Äthyl-Chlorophyllid in Ringer, 2,5 . 10^{-2} mol. $NaHCO_3$	O_2 V_f 5 V_g 9,10 K_{O_2} 0,87 K_{CO_2} 1,1 Hp. 10^{-4} mol in $^1/_2$ mol. Phosphat	O_2 V_f 5 V_g 8,6 K_{O_2} 0,83 K_{CO_2} 1,03 Rose Bengale 10^{-4} mol. in $^1/_2$ mol. Phosphat
15′	—	—	0	0
30	—1	—2	—	—
60	—3	—3	—	—

Protokoll 12. Casein und Farbstoff belichtet.

Versuche 1 bis 3 sind mit einer 1proz. Caseinlösung in ½ mol. Phosphat gemacht (9,5 sec. + 0,5 prim. p_H etwa 7,7 nach *Sörensen*). Versuch 4: 0,5 g Casein in 5 ccm n/10 NaOH + 10 ccm $NaHCO_3$ 13 : 1000 aufgefüllt auf 50 ccm. Gesättigt mit 4,6 Proz. CO_2 in O_2. Reaktion: neutral.

Gasanalyse. Temperatur = 18°.

75 Watt in 15 cm Entfernung.

Nr.	Farbstoff in V_f mg	t Stunden	V_f	V_g	Proz. I CO_2	Proz. I O_2	Proz. I N_2	p	G_n	G_r
1	0,56 Hp.	18	5	7,35	0	20,90	79,10	765	10,96	4,66
2	0,28 „	20	5	7,35	0,26	20,58	79,16	755	11,00	4,65
3	1,0 R. B.	16	5	7,20	0	20,90	79,10	761	10,97	4,64
4	0,56 Hp.	18	5	9,20	4,60	67,00	28,40	764	14,75	6,29

Nr.	G_e	n. Kalil.	n. Hydros.	Proz. II CO_2	Proz. II O_2	Proz. II N_2	X_{O_2}	X_{CO_2}	CO_2/O_2
1	6,30	10,95	10,15	0,2	12,80	87,00	650	—*)	—
2	6,35	10,99	10,06	0,15	14,65	85,20	480	—*)	—
3	6,33	10,97	10,09	0	13,80	86,20	560	—*)	—
4	8,46	14,30	8,76	5,37	65,40	29,23	300	70	0,23

*) In der Phosphatlösung wird die entstehende CO_2 zurückgehalten.

Protokoll 13. Gebildete CO_2 in Versuch *12*, 2, 3.

	Vorher		2 Nachher	3
V_f	2,2	2,2	2,2	1,2
V_g	17,93	17,93	17,93	18,93
Temperatur . . . °C	17,4	18,3	18,5	21
K_{CO_2}	1,80	1,76	1,75	1,82
Caseinlösung . . . ccm	2	2	2	0,8364 g
CO_2 im Gas des Rezipienten . . Proz.	0,26	0,0	0,16	0,0
CO_2 im Gas des Manometers . . Proz.	0 (Luft)	0 (Luft)	0 (Luft)	(Luft)
Manometerausschlag . . . mm	+ 35	+ 36	+ 56	+ 19
cmm berechnet auf die Lösung im Rezipienten	158	160	245	208
Entstandene CO_2 . . . cmm	—	—	86	49

Ammoniak zu Versuch 2.

Vorher. 3 ccm 1 proz. Casein enthielten		Nachher. 2 ccm behandelt nach *Folin*	Differenz berechnet auf 5 ccm	Absorbierte O_2	NH_3/O_2
a) 0,30	b) 0,25	0,60 ccm n/500	1,05 ccm n/500	480 cmm	1/10
ccm n/500 NH_3					

Protokoll 14.

Casein + Farbstoff in Carbonatlösung.

1 g Casein gelöst in 10 ccm n/10 NaOH + 9 ccm $NaHCO_3$ 13 : 1000 + 40 ccm H_2O gesättigt mit 5 Proz. CO_2 in O_2. 0,8992 g Lösung enthalten 539 cmm CO_2 1 g = 600 cmm CO_2.

Temperatur = 20°.

	5 Proz. CO_2-O_2 V_f 5 V_g 9,1 K_{O_2} 0,86 K_{CO_2} 1,27 0,18 *mg Hp.*	5 Proz. CO_2-O_2 V_f 5 V_g 8,6 K_{O_2} 0,82 K_{CO_2} 1,22 0,27 *mg Erythrosin*	5 Proz. CO_2-O_2 V_f 5 V_g 6,3 K_{O_2} 0,60 K_{CO_2} 1,01 0,11 *g Methylenblau*
27' hell	—114	—147	—172
10 dunkel . .	—0,5	—0,5	0

75 Watt in 15 cm Entfernung.

Protokoll 15.

1 Proz. Casein, 10^{-5} n Rose Bengale, ½ mol. Phosphat.

Temperatur = 20°.

Belichtungszeit	a) 95 ccm sek. Phosphat, 5 „ prim. „, p_H etwa 7,7. O_2 V_f 5 V_g 9,1 K_{O_2} 0,87 0,05 ccm n/100 Rose Bengale	b) 70 ccm sek. Phosphat, 30 „ prim. „, p_H etwa 7,0. O_2 V_f 5 V_g 8,6 K_{O_2} 0,82 0,05 ccm n/100 Rose Bengale
15'	— 86	— 76
30	—164	—146
60	—266	—241
120	—371	—353

75 Watt in 15 ccm Entfernung.

Protokoll 16.

Nucleinsäure.

9,2 ccm 2 proz. nucleinsaures Natrium + 1,8 ccm $NaHCO_3$ 13 : 1000. 1 g = 456 cmm CO_2 = 2,031 . 10^{-5} mol. p_H etwa 7,2.

Temperatur = 20°.

	5 Proz. CO_2-O_2 V_f 3 V_g 8,3 Ohne Farbstoff	5 Proz. CO_2-O_2 V_f 3 V_g 10,9 K_{O_2} 1,03 K_{CO_2} 1,29 0,1 ccm m/100 *Erythrosin*	5 Proz. CO_2-O_2 V_f 3 V_g 10,6 K_{O_2} 1,0 K_{CO_2} 1,26 0,1 ccm m/100 *Methylenblau*
30' hell . . .	0	—10	—6
10 dunkel . .	0	0	0

75 Watt in 15 cm Entfernung.

Protokoll 17.

Photoxydation und Sauerstoffpartialdruck.

Hühnereiweiß, frisch, filtriert in 100, 21 und 6 Proz. O_2.

Sensibilisator: Hp. etwa 10^{-4} mol.

Temperatur = 18° C.

Belichtung	100 Proz. O_2 0,15 ccm n/500 Hp. V_f 2,15 V_g 11,95 K_{O_2} 1,13 K_{CO_2} 1,3	21 Proz. O_2 (Luft) 0,15 ccm n/500 Hp. V_f 2,15 V_g 11,75 K_{O_2} 1,11 K_{CO_2} 1,28	6 Proz. O_2—N_2 0,15 ccm n/500 Hp. V_f 2,15 V_g 11,95 K_{O_2} 1,13 K_{CO_2} 1,30
5'	—83	—59	—29
5	—81	—60	—29

60 Watt in 10 cm Entfernung.

Protokoll 18.

Einfluß der Temperatur.

Je 3 ccm Hühnereiweiß + 0,15 ccm m/500 Hp.: 10^{-4} mol.

Gasraum: Luft (21 Proz. O_2).

	$T = 4,6^0 \pm 0,1$ V_f 3,15 V_g 10,95 K_{O_2} 1,09 K_{CO_2} 1,53	$T = 8,0^0 \pm 0,1$ V_f 3,15 V_g 10,95 K_{O_2} 1,08 K_{CO_2} 1,46	$T = 13,4^0 \pm 0,1$ V_f 3,15 V_g 10,95 K_{O_2} 1,05 K_{CO_2} 1,38
10' dunkel .	± 0	± 0	—1
15 hell . .	—161	—167	—184
10 dunkel .	—2	—6	—2
Dunkel . .	15' —1	40' —1	

	$T = 19,5^0 \pm 0,0$ V_f 3,15 V_g 10,95 K_{O_2} 1,03 K_{CO_2} 1,31	$T = 25,8^0 \pm 0,1$ V_f 3,15 V_g 10,95 K_{O_2} 1,00 K_{CO_2} 1,24	$T = 31,0^0 \pm 0,1$ V_f 3,15 V_g 10,95 K_{O_2} 0,975 K_{CO_2} 1,17
10' dunkel .	± 0	± 0	± 0
15 hell . .	—207	—219	—223
10 dunkel .	—1	—	—
Dunkel . .			50' —3

Zweimal 60 Watt in 20 cm Entfernung.

Protokoll 19.

Meso-, Uro- und Koproporphyrin in Serum belichtet.

(Präparate Prof. *H. Fischer*, München.)

Mesoporphyrin, $C_{34}H_{38}O_4N_4Na_2$ (Natriumsalz). Molekulargewicht 610. Lösung mit Serum verdünnt auf 10^{-4} mol.

Uroporphyrin, $C_{40}H_{36}O_{16}N_4$. Molekulargewicht 828. 0,83 mg in 10 ccm Serum: 10^{-4} mol.

Koproporphyrin, $C_{36}H_{36}O_8N_4$. Molekulargewicht 652. 0,65 mg in 10 ccm Serum: 10^{-4} mol.

Temperatur = 18° C.

Belichtet	Mesoporphyrin. 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 3,2 V_g 9,7 K_{O_2} 0,92 K_{CO_2} 1,17 $\frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}} = 1{,}14$	Uroporphyrin. 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 3 V_g 9,1 K_{O_2} 0,86 K_{CO_2} 1,09 $\frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}} = 1{,}02$	Koproporphyrin. 5 Proz. CO_2—O_2 V_f 3 V_g 11,1 K_{O_2} 1,05 K_{CO_2} 1,28 $\frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}} = 1{,}32$
10′	— 104	— 196	— 74
20	— 204	— 390	— 157
30	— 294	— 520	— 226

60 Watt in 15 cm Entfernung.

Protokoll 20.

Serum und Serum-Ultrafiltrat + Hp.

Das Ultrafiltrat nach *Bechhold* gab beim Erhitzen mit HNO_3 keine Opaleszenz.

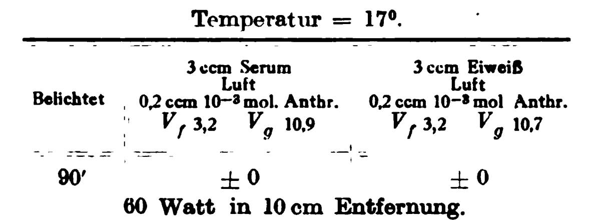
Belichtet	T = 17,5° (Luft) Serum 0,1 ccm m/500 Hp. V_f 3,1 V_g 11,0 K_{O_2} 1,04 K_{CO_2} 1,34	T = 17,5° (Luft) Serum-Ultrafiltrat 0,1 ccm m/500 Hp. 0,4 ccm n/10 NaOH V_f 3,5 V_g 10,4 K_{O_2} 1 K_{CO_2} 1,3	Belichtet	T = 16° (Luft) Serum-Ultrafiltrat 0,2 ccm m/500 Hp. V_f 2,2 V_g 9,1 K_{O_2} 0,87 K_{CO_2} 1,07	T = 16° (Luft) Ultrafiltrat + Rückstand 0,2 ccm m/500 Hp. V_f 2,2 V_g 11,9 K_{O_2} 1,2 K_{CO_2} 1,34
30′	— 320	— 20	20′	— 14	— 255

75 Watt in 15 cm Entfernung.

Protokoll 21.

Anthrachinondisulfosaures Natrium (Lösung 0,4122 g : 1000 = 10^{-3} mol.) und Serum.

Temperatur = 17°.



Belichtet	3 ccm Serum Luft 0,2 ccm 10^{-3} mol. Anthr. V_f 3,2 V_g 10,9	3 ccm Eiweiß Luft 0,2 ccm 10^{-3} mol Anthr. V_f 3,2 V_g 10,7
90′	± 0	± 0

60 Watt in 10 cm Entfernung.

Protokoll 22.

Metallverbindungen des Hämatoporphyrins und Hämin in Eiweißlösung belichtet.

Hämin, kristallisiert, dargestellt aus Blut nach *Willstätter*.

Kupfersalz des Hp., dargestellt nach *Dhéré* und *v. d. Bom* aus ammoniakalischer Lösung.

0,0651 g Substanz gaben 0,0081 g CuO.

Ber.: 9,67 Proz. Cu, gef.: 9,93 Proz. Cu.

Zinksalz des Hp., dargestellt wie das Cu-Salz.

0,1285 g Substanz gaben 0,02439 g ZnO.

Ber.: 14,2 Proz. Zn, gef.: 15,1 Proz. Zn.

Silbersalz des Hp., aus Ammoniak mit Essigsäure gefällt.

Temperatur = 17°. Gas: Luft (Hämatoporphyrin zum Vergleich).

Belichtet	T = 17°				T = 18°
	10^{-4} mol. *Hämin*	0,2 ccm 10^{-3} mol. *Cu Hp.*	0,2 ccm 10^{-3} mol. *Zn Hp.*	0,2 ccm m/500 *Ag Hp.*	0,2 ccm 10^{-3} mol. Hp.
	V_f 3 V_g 11,1	V_f 2,2 V_g 9,9	V_f 2,2 V_g 11,9	V_f 2,2 V_g 11,7	V_f 2,2 V_g 11,9
	—	K_{O_2} 0,94	K_{O_2} 1,13	K_{O_2} 1,11	K_{O_2} 1,13
	—	K_{CO_2} 1,15	K_{CO_2} 1,33	K_{CO_2} 1,31	K_{CO_2} 1,33
10′	— 1	0	— 82	0	— 79
20	± 0	— 1	— 150	0	— 145
30	—	— 1	— 298	0	—

Protokoll 23.

Einfluß der Gallensäuren auf die Photoxydation von Eiweiß durch Sensibilisatoren.

a) I. Fel tauri dep. sicc. *Merck*. Temperatur = 20°.

Belichtet	2 ccm Eiweiß, 123 mg Fel tauri in 2 ccm H_2O	2 ccm Eiweiß, 7 mg Erythrosin in 1 ccm H_2O	2 ccm H_2O, 14 mg Erythrosin, 123 mg Fel tauri in 1 ccm H_2O	2 ccm Eiweiß, 7 mg Erythrosin in 1 ccm H_2O, 123 mg Fel tauri in 1 ccm H_2O
	21 Proz. O_2 (Luft)	21 Proz. O_2 (Luft)	21 Proz. O_2 (Luft)	21 Proz. O_2 (Luft)
	V_f 4 V_g 9,9	V_f 3 V_g 11,1	V_f 3 V_g 9,1	V_f 4 V_g 9,9
	K_{O_2} 0,94 K_{CO_2} 1,26	K_{O_2} 1,04 K_{CO_2} 1,37	K_{O_2} 0,86 K_{CO_2} 1,19	K_{O_2} 0,94 K_{CO_2} 1,26
10′	— 14	— 36	— 22	— 139
20	— 26	— 77	— 31	— 269
30	— 36	— 122	— 38	— 390

60 Watt in 20 cm Entfernung.

II. Lösungen: 1. Fel tauri 1 : 4 in H_2O.

2. Hämatoporphyrin 12 mg in 10 ccm n/200 NaOH (= m/500 Hp.).

3. Eiweiß (Eier 2 Wochen alt). Mit Glasperlen geschüttelt und filtriert.

Gasraum: Luft. Temperatur = 20°.

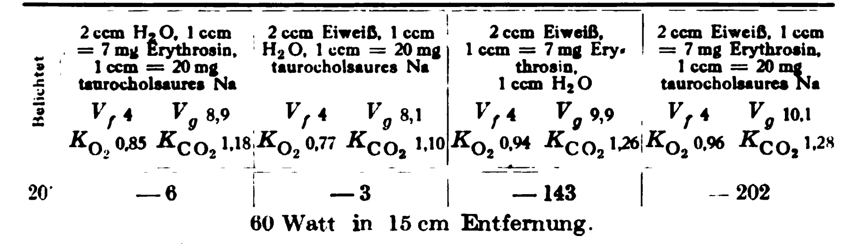
Belichtet	2 ccm Eiweiß, 0,1 ccm = 0,12 mg Hp.-lösung	2 ccm Eiweiß, 0,1 ccm = 0,12 mg Hp., 0,2 ccm 1 : 200 Fel tauri = 1 mg	2 ccm Eiweiß, 0,1 ccm = 0,12 mg Hp., 0,1 ccm 1 : 4 Fel tauri = 25 mg
	V_f 2,1 V_g 10,8	V_f 2,3 V_g 11,8	V_f 2,2 V_g 11,7
	K_{O_2} 1,01 K_{CO_2} 1,19	K_{O_2} 1,11 K_{CO_2} 1,30	K_{O_2} 1,10 K_{CO_2} 1,28
20′	— 159	— 270	— 292
40	— 307	— 481	— 535

60 Watt in 20 cm Entfernung.

b) Taurocholsaures Na ($C_{26}H_{44}O_7NSNa$ = 537,4).

Lösungen: 1. 70 mg Erythrosin in 10 ccm H_2O.
2. 200 mg taurocholsaures Na in 10 ccm H_2O.
3. Eiweiß, geschlagen und kolliert.

Im Gasraum: Luft. Temperatur = 20°.

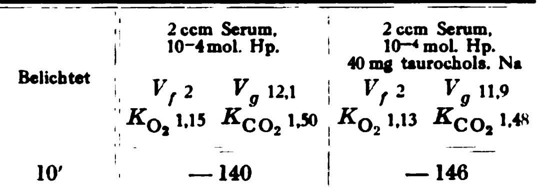


Belichtet	2 ccm H_2O, 1 ccm = 7 mg Erythrosin, 1 ccm = 20 mg taurocholsaures Na V_f 4 V_g 8,9 K_{O_2} 0,85 K_{CO_2} 1,18	2 ccm Eiweiß, 1 ccm H_2O, 1 ccm = 20 mg taurocholsaures Na V_f 4 V_g 8,1 K_{O_2} 0,77 K_{CO_2} 1,10	2 ccm Eiweiß, 1 ccm = 7 mg Erythrosin, 1 ccm H_2O V_f 4 V_g 9,9 K_{O_2} 0,94 K_{CO_2} 1,26	2 ccm Eiweiß, 1 ccm = 7 mg Erythrosin, 1 ccm = 20 mg taurocholsaures Na V_f 4 V_g 10,1 K_{O_2} 0,96 K_{CO_2} 1,28
20'	— 6	— 3	— 143	— 202

60 Watt in 15 cm Entfernung.

c) Taurocholsaures Na und Serum + Hp.

Im Gasraum: Luft. Temperatur = 17°.



Belichtet	2 ccm Serum, 10^{-4} mol. Hp. V_f 2 V_g 12,1 K_{O_2} 1,15 K_{CO_2} 1,50	2 ccm Serum, 10^{-4} mol. Hp. 40 mg taurochols. Na V_f 2 V_g 11,9 K_{O_2} 1,13 K_{CO_2} 1,48
10'	— 140	— 146

75 Watt in 15 cm Entfernung.

Protokoll 24.

Tyrosin, alkalisch, mit Sensibilisatoren, belichtet.

163 mg in 100 ccm n/10 NaOH ⟶ 0,9/100 n Tyrosin.

Gasraum: Luft. Temperatur = 20,5°.

Zeit	3 ccm 0,9/100 n Tyrosin, 2 mg Hämatoporphyrin, 3 mg Rose Bengale V_f 3 V_g 27,5 K_{O_2} 2,57 —	a) $X K_{O_2}$ cmm	3 ccm n/10 NaOH, 2 mg Hp., 3 mg Rose Bengale V_f 3 V_g 8,3 K_{O_2} 0,78 —	b) $X K_{O_2}$ cmm	a — b cmm
15' dunkel	± 0	—	± 0		
40' hell	— 265	— 681	— 20	— 16	665
110 „	— 679	— 1750	— 49	— 38	1712
175 „	— 849	— 2180	— 74	— 58	2122
240 „	— 961	— 2470	— 102	— 80	2390
300 „	— 1043	— 2680	— 134	— 104	2580
350 „	— 1083	— 2790	— 150	— 117	2670
410 „	— 1128	— 2890	— 171	— 133	2757

Zweimal 60 Watt in 15 ccm Entfernung.

Bestimmung der gebildeten Kohlensäure.
Gasraum: Luft. Temperatur = 20°.

	2 ccm der belichteten Tyrosinlösung V_f 2,2 V_g 17,93 K_{CO_2} 1,84	2 ccm Tyrosinlösung (ohne Farbstoff belichtet) V_f 2,2 V_g 17,8 K_{CO_2} 1,83	In 3 ccm 0,9/100 n Tyrosin gebildete CO_2 cmm	absorbierter O_2 cmm
Angesäuert .	+ 364	+ 37	903	2757
$X K_{CO_2}$ . . .	670 ccm	68 ccm	O_2/CO_2 = 3,05	
Differenz . .	602 cmm			

Protokoll 25.

Lichtoxydation des Phenols in alkalischer Lösung durch Hämatoporphyrin.
1. 56 mg C_6H_6O gelöst in 25 ccm n/5 NaOH. 0,33 ccm hiervon + 10 ccm H_2O + 5,5 mg Hp. (0,2 ccm) = 0,74 mg C_6H_6O in 10,5 ccm etwa n/150 NaOH. 3 ccm = 0,21 mg C_6H_6O, 1,65 mg Hp.
Gasraum: Luft. Temperatur = 37°.

Zeit:	15′	45′	75′	105′	135′	165′	225′
V_f 3 V_g 11,1 . K_{O_2} 0,98 . . .	— 118	— 162	— 186	— 206	— 225	— 240	— 271
$X K_{O_2}$. cmm	116	159	182	202	220	235	265
	Autoxydation des Hp. in 225 — 165 = 60′: 30 cmm						
X_{O_2} korrigiert	109	137	152	152	153	153	153

berechnet für 0,21 mg und 3 O_2 148 cmm O_2
75 Watt in 15 cm Entfernung.

2. 94 mg gelöst in 100 ccm n/20 NaOH = m/100 C_6H_6O.
Gasraum: Luft. Temperatur = 22,8°.

Zeit:	20′	50′	100′	140′	185′	215′
1 ccm n/100 = 0,94 mg C_6H_6 . . . . 1 ccm H_2O, 3 mg Hp. V_f 2 V_g 10,9 . . . . K_{O_2} 1,02	— 288	— 574	— 677	— 727	— 770	— 790
$X K_{O_2}$ . . . . cmm	294	585	691	741	785	806
	Autoxydation des Hp. in 215 — 185 = 30′: 21 cmm					
X_{O_2} korrigiert . . .	280	550	621	644	656	656

Berechnet: 3 × 224 = 672 cmm O_2

Kontrollen.

Zeit	2,3 mg C_6H_6O, 3 ccm n/100 NaOH V_f 3 V_g 10,9 K_{O_2} 0,97	Zeit	8 mg Hp., 3 ccm n/100 NaOH V_f 3 V_g 8,3 K_{O_2} 0,84	Zeit	3 mg Hp., 2 ccm n/10 NaOH V_f 2 V_g 10,1 K_{O_2} 0,93
210′	— 15	240′	— 90	180′	— 150

Protokoll 26.

Oxydation von Harnsäure durch Rose Bengale im Licht.

1. 168 mg Harnsäure + 30 ccm n/10 NaOH in 100 ccm H_2O = m/100 harnsaures Natrium in m/100 NaOH.

	Zeit	1 ccm m/100 harns. Na, 2 ccm H_2O, 15 mg Rose Bengale V_f 3 V_g 27,5 K_{O_2} 2,57	Zeit	2 ccm m/100 harns. Na, 3 ccm H_2O, 15 mg Rose Bengale V_f 5 V_g 25,5 K_{O_2} 2,38
Dunkel	15′	± 0	10′	± 0
Hell	16	— 77	8	— 87
„	23	— 83	16	— 166
„	35	— 82	24	— 180
„	—	—	36	— 180
ΣK_{O_2} = cmm O_2		— 214		428
Ber. für 1 O_2 auf 1 Harnsäure		224		448

Zweimal 60 Watt in 15 cm Entfernung.

2. Bestimmung der gebildeten Kohlensäure.

Gasraum: Luft.

$\alpha^{CO_2}_{22^0}$ für verd. H_2SO_4 0,7	Temperatur 22,4° Oxydiert V_f 2,2 V_g 17,93 K_{CO_2} 1,81 1,2 cm m/100 harnsaures Na belichtet	Temperatur 22,4° Frisch V_f 2,2 V_g 17,8 K_{CO_2} 1,80 2 cm m/100 harnsaures Na	Temperatur 22° Oxydiert V_f 2,2 V_g 17,8 K_{CO_2} 1,80 1,2 cm m/100 harnsaures Na belichtet	Temperatur 22° Frisch V_f 2,2 V_g 17,93 K_{CO_2} 1,81 2cm m/100 harnsaures Na
Angesäuert . .	+ 167	+ 28	+ 183	+ 32
ΣK_{CO_2} . cmm	302	50	329	58
In 1 ccm m/100	251	25	274	29
Differenz . . .	226		245	

Berechnet für 1 CO_2 auf 1 Harnsäure 224 ccm.

Beiträge zur Physiologie der Schilddrüse.

Von

G. Mansfeld.

X. Mitteilung[1]):

Prämortaler Eiweißzerfall bei schilddrüsenlosen Hunden.

Von

Anna Lánczos.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Pécs, Ungarn.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1926.)

An hungernden Tieren tritt bekanntlich vor dem Hungertode oft eine Erhöhung der Stickstoffausscheidung auf.

In einer früheren Arbeit haben *Mansfeld* und *Hamburger*[2]) nachgewiesen, daß die Schilddrüse einen Einfluß auf diesen Anstieg der Stickstoffausscheidung, den sogenannten prämortalen Eiweißzerfall ausübt. Sie fanden nämlich, daß bei normalen Kaninchen die Stickstoffausscheidung an den letzten beiden Tagen vor dem Hungertode um 110 bis 180 Proz. ansteigt, dagegen bei schilddrüsenlosen Tieren der Anstieg nur 15 bis 20 Proz. beträgt. Die Richtigkeit dieses Ergebnisses wurde von *Hári*[3]) durch rein theoretische Überlegungen bezweifelt, experimentell jedoch nicht nachgeprüft, bis in letzterer Zeit *Mangold*[4]) zwei Versuche veröffentlichte, in welchen der prämortale Eiweißzerfall an schilddrüsenlosen Hunden ähnlich hoch ausfiel, wie an normalen Kontrolltieren. Anläßlich der Veröffentlichung von *Mangold* wurde ich von Herrn Prof. *Mansfeld* aufgefordert, weitere Hungerversuche an schilddrüsenlosen Hunden vorzunehmen, und über das Ergebnis derselben soll im folgenden berichtet werden. *Mangold* hebt nicht hervor, daß die Versuche von *Mansfeld* bis auf einen einzigen[5]) nicht an Hunden, sondern an Kaninchen ausgeführt wurden. Kaninchen dürften zur Prüfung dieser Frage auch geeignetere Versuchstiere sein als Hunde. Bei Hunden soll nämlich auch normalerweise der prämortale Eiweißzerfall häufiger ausbleiben als beim Kaninchen. Außerdem vertragen die Hunde das Hungern oft 40 bis 60 Tage lang, so daß

---

[1]) Vgl. Pflügers Arch. **148, 152, 161** und **181.**

[2]) *Mansfeld* und *Hamburger*, ebendaselbst **152,** 50.

[3]) *Hári*, ebendaselbst **176,** 123.

[4]) *Mangold*, diese Zeitschr. **168,** 178, **1926.**

[5]) *Mansfeld*, Pflügers Arch. **161,** 504.

sie, auch wenn der Versuch unmittelbar nach der Schilddrüsenexstirpation begonnen wird, meistens erst im zweiten Monat nach der Operation dem Hungertode erliegen. Zu diesem Zeitpunkte kann aber bekanntlich beim Hunde die Tätigkeit der Schilddrüse bereits durch andere Drüsen ersetzt sein. So schreibt z. B. *Eppinger*[1]) ausdrücklich, daß die thyreopriven Erscheinungen beim Hunde nur im ersten Monat nach der Entfernung der Schilddrüse ausgesprochen sind. Auch *Grafe*[2]) erwähnt, daß die Veränderungen, welche die Schilddrüsenexstirpationen verursacht, bei kleineren Tieren im Laufe der Zeit wieder verschwinden.

Diesen Umstand hat jedoch *Mangold* gar nicht berücksichtigt und eines seiner thyreopriven Tiere erst 5 Wochen, das andere sogar erst 7 Monate nach der Operation zum Versuch eingestellt. Dementsprechend tritt der Hungertod in seinen zwei Versuchen erst gegen Ende des zweiten bzw. achten Monats nach erfolgter Operation ein, also zu einer Zeit, wo nach dem Gesagten kaum mehr Ausfallserscheinungen zu erwarten sind.

In Anbetracht der genannten Verhältnisse richteten wir unsere Versuche derart ein, daß der Hungertod im Laufe des ersten Monats nach der Operation zu erwarten war.

Zu diesem Zwecke ließen wir die Hunde schon vor der Schilddrüsenexstirpation hungern, bei einer Gewichtsabnahme von ungefähr 25 Proz. wurde die Operation von Herrn Prof. ***Mansfeld***, unter Schonung von mindestens zwei Epithelkörperchen, ausgeführt. Einige Tage vor der Operation begannen wir die Stickstoffausscheidung pro 24 Stunden nach ***Kjeldahl*** zu bestimmen, die Bestimmungen wurden dann fortgesetzt bis zum Tode des Tieres, der in unseren Versuchen 10 bis 24 Tage nach der Operation eintrat. Die Harnblase wurde täglich zur selben Stunde mit Katheter entleert und mit 3proz. Borsäurelösung ausgewaschen. Die Technik war sonst die bei Stoffwechselversuchen übliche.

In dieser Weise haben wir vier Versuche ausgeführt, die in den folgenden Tabellen zusammengestellt sind.

Tabelle I.

Hund Nr. 1. Gewicht 4500 g.

Datum 1926	Hungertag	Gewicht kg	Temperatur vorm.	Temperatur nachm.	Diurese ccm	Harnstickstoff g
21. IV.	1.	4,50				
22. IV.	2.	4,20				
23. IV.	3.	4,08				
24. IV.	4.	3,96				
25. IV.	5.	3,80				
26. IV.	6.	3,68				
27. IV.	7.	3,66			50	1,078

[1]) *Eppinger*, Zur Pathol. u. Therapie des menschlichen Ödems, S. 72. Springer 1917.

[2]) *Grafe* in Asher-Spiros Ergebnisse der Physiologie **21**, II. Abt., S. 243.

Tabelle I (Fortsetzung).

Datum	Hungertag	Gewicht kg	Temperatur vorm.	Temperatur nachm.	Diurese ccm	Harnstickstoff g
28. IV.	8.	3,58	38,9	38,2	50	0,474 *)
29. IV.	9.	3,52	38,8	38,8	60	1,593
30. IV.	10.	3,40	38,7	37,9	60	1,545
1. V.			Schilddrüsenexstirpation			
1. V.	11.	3,34	—	—	60	1,270
2. V.	12.	3,24	38,8		35	1,617
3. V.	13.	3,12	38,0		100	1,480
4. V.	14.	3,00	38,3	38,0	50	1,600
5. V.	15.	2,94	38,0	37,8	50	1,433
6. V.	16.	2,90	37,9	37,7	60	1,474
7. V.	17.	2,84	37,1	36,9	65	1,604
8. V.	18.	2,74	35,8	35,6	50	1,594
9. V.	19.	2,66	33,7	32,25	90	1,611
10. V.	20.					Exitus

*) Diarrhöischer Stuhl.

Tabelle II.

Hund Nr. 2. Gewicht 5300 g.

Datum 1926	Hungertag	Gewicht kg	Temperatur vorm.	Temperatur nachm.	Diurese ccm	Harnstickstoff g
21. IV.	1.	5,30				
22. IV.	2.	5,22				
23. IV.	3.	5,14				
24. IV.	4.	5,06				
25. IV.	5.	4,90				
26. IV.	6.	4,80				
27. IV.	7.	4,74				
28. IV.	8.	4,60				
29. IV.	9.	4,54				
30. IV.	10.	4,50				
1. V.	11.	4,42				
2. V.	12.	4,24				
3. V.	13.	4,20	38,0		40	1,527
4. V.	14.	4,14	37,7	37,9	60	1,437
5. V.	15.	4,00	37,6	38,1	50	1,337
6. V.			Schilddrüsenexstirpation			
6. V.	16.	3,96	37,7	38,0	45	1,294
7. V.	17.	3,86	38,5	38,7	55	1,410
8. V.	18.	3,82	37,3	37,7	45	1,696
9. V.	19.	3,72	37,3	37,6	50	1,733
10. V.	20.	3,70	36,7	37,6	35	1,647
11. V.	21.	3,64	37,55	37,6	40	1,546
12. V.	22.	3,62	36,3	37,3	30	1,322
13. V.	23.	3,56	36,25	37,1	40	1,540
14. V.	24.	3,52	35,5	36,1	40	1,294
15. V.	25.	3,36	36,15	36,4	40	1,466
16. V.	26.	3,28	35,9	36,05	40	1,322
17. V.	27.	3,20	35,5	35,55	50	1,409
18. V.	28.	3,16	34,8	34,55	40	1,409
19. V.	29.	3,06	34,1	32,25	60	1,554
20. V.	30.	2,96	25,25		60	0,819 Exitus

Tabelle III. Hund Nr. 3. Gewicht 8500 g.

Datum 1926	Hungertag	Gewicht kg	Temperatur vorm.	Temperatur nachm.	Diurese ccm	Harnstickstoff g
27. II.	2.	8,20				
28. II.	3.	—				
1. III.	4.	7,70				
2. III.	5.	7,60				
3. III.	6.	7,54				
4. III.	7.	7,32				
5. III.	8.	7,20				
6. III.	9.	7,00				
7. III.	10.	6,78				
8. III.	11.	6,70				
9. III.	12.	6,62			30	1,455
10. III.	13.	6,40			40	1,322
11. III.	14.	6,30			30	0,862
12. III.	15.	6,20			40	1,293
13. III.	16.	6,12			90	1,426
14. III.	17.	6,02			50	1,145
15. III.			Schilddrüsenexstirpation			
15. III.	18.	5,92			45	1,437
16. III.	19.	5,70			—	—
17. III.	20.	5,40			—	—
18. III.	21.	5,40			50	1,797
19. III.	22.	5,34			50	1,890
20. III.	23.	—	38,7	38,65	150	1,967
21. III.	24.	5,02	38,9	38,6	110	1,670
22. III.	25.	4,94	38,7	38,5	70	1,465
23. III.	26.	4,86	38,1	37,4	60	1,594
24. III.	27.	4,84	38,1	37,7	60	1,380
25. III.	28.	4,74	38,1	37,4	—	1,380
26. III.	29.	4,64	37,6	37,6	40	1,105
27. III.	30.	4,60	37,7	37,7	35	0,632
28. III.	31.	4,52	38,0	37,6	45	0,948
29. III.	32.	4,38	37,5	37,55	40	1,071
30. III.	33.	4,34	37,25	37,20	50	1,082
31. III.	34.	4,30	37,1	37,3	50	0,977
1. IV.	35.	4,28	37,0	37,05	60	1,322
2. IV.	36.	4,20	36,8	36,9	50	1,192
3. IV.	37.	4,12	36,4	36,4	50	1,020
4. IV.	38.	4,04	36,8	37,0	50	1,144
5. IV.	39.	4,00	36,3	36,15	50	1,552
6. IV.	40.	3,86	35,4	35,25	50	1,359
7. IV.	41.	3,78	34,4	33,5	70	1,754
8. IV.	42.	3,66	—	—	90	1,744 Exitus

Tabelle IV.

Hund Nr. 4. Gewicht 8700 g.

Datum 1926	Hungertag	Gewicht kg	Temperatur vorm.	Temperatur nachm.	Diurese ccm	Harnstickstoff g
27. II.	2.	8,40				
28. II.	3.	—				
1. III.	4.	7,70				
2. III.	5.	7,40				
3. III.	6.	7,25				
4. III.	7.	7,04				
5. III.	8.	6,98				
6. III.	9.	6,76				
7. III.	10.	6,46				
8. III.	11.	6,40				
9. III.	12.	6,32			50	1,689
10. III.	13.	6,22			90	1,624
11. III.	14.	6,08			70	1,480
12. III.			Schilddrüsenexstirpation			
12. III.	15.	5,92			70	1,512
13. III.	16.	5,84			—	—
14. III.	17.	5,80			—	—
15. III.	18.	5,60			100	1,817
16. III.	19.	5,50			150	1,566
17. III.	20.	5,20			90	1,399
18. III.	21.	5,14			80	1,437
19. III.	22.	5,04			80	1,360
20. III.	23.	—	37,7	37,6	130	1,646
21. III.	24.	4,86	38,0	37,6	110	1,423
22. III.	25.	4,80	38,3	37,7	110	1,657
23. III.	26.	4,64	38,15	37,5	120	1,820
24. III.	27.	4,62	37,6	37,6	100	1,866
25. III.	28.	4,54	37,5	37,4	110	1,813
26. III.	29.	4,36	37,3	36,6	110	1,739
27. III.	30.	4,18	35,4	34,4	170	2,947
28. III.	31.	3,84	unter 33		130	2,579 Exitus

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, bleibt die Stickstoffausscheidung im Versuch 1 und 2 während des ganzen Verlaufs ziemlich gleichmäßig und erfährt auch in den letzten Tagen keine Erhöhung. Im Versuch 3 ist die Stickstoffausscheidung weniger konstant, sondern sinkt vom neunten Tage nach der Operation allmählich ab, steigt vom achten Tage vor dem Tode mit geringen Schwankungen wieder bis zur ursprünglichen Höhe und erfährt an den letzten beiden Tagen einen kleinen Anstieg, welcher jedoch weit geringer ist als der typische prämortale Eiweißzerfall, welcher unter anderem auch in den *Mangold*schen Versuchen in Erscheinung tritt.

Allerdings müssen wir betonen, daß wir bei der Beurteilung der Frage, ob ein prämortaler Eiweißzerfall vorhanden ist, wohl mit Recht das Verhalten der Stickstoffausscheidung an den letzten Lebenstagen in Betracht ziehen, was der allgemein üblichen

Definition des Begriffs „prämortaler Eiweißzerfall“ entspricht. Wenn *Hári*[1]) annimmt, daß auch solche Anstiege der Stickstoffausscheidung, welche 5 bis 6 Tage und früher vor dem Hungertode auftreten, sich von den prämortalen prinzipiell nicht unterscheiden, so ist das eben eine Auffassung, welche von anderen Autoren nicht geteilt wird. *Morgulis* bezeichnet z. B. in seiner zusammenfassenden Studie über *Hunger und Unterernährung* als prämortalen Anstieg eine *plötzliche Zunahme in der Stickstoffausscheidung*, welche *kurz vor dem Tode* auftritt und mit dem nahen Ende des Hungers zusammenfällt. Auch *Mangold* berichtet über prämortalen Eiweißzerfall in den letzten 2 bis 3 Lebenstagen. Ferner schreibt *Schultz*[2]) in der Besprechung seines Hungerversuchs anläßlich eines Anstiegs der Stickstoffausscheidung, daß dieser nicht als prämortaler aufgefaßt werden kann, da die gesteigerte Stickstoffausscheidung sich über 7 Beobachtungstage erstreckt.

Die Berechtigung dieser unserer Auffassung ist auch ohne weiteres aus den hier, ferner in der genannten Arbeit von *Mansfeld* und *Hamburger*, schließlich von *Mangold* selbst veröffentlichten Versuchstabellen zu ersehen, welche ein steiles Ansteigen der Stickstoffwerte über sämtliche Werte der Hungerperiode 2 bis 3 Tage vor dem Tode zeigen. So trat dieser typische prämortale Eiweißzerfall in allen Normalversuchen von *Mansfeld* und *Hamburger*, in Versuch 2 und 3 von *Mangold* und in unserem Versuch 4, welcher gleich näher besprochen werden soll, an den letzten beiden Lebenstagen auf. Im Versuch 1 von *Mangold* beginnt er 3 Tage vor dem Tode und auch in *Mangolds* Versuch 4, wo die Stickstoffausscheidung von Beginn an eine steigende Tendenz zeigt, ist ein steiler Anstieg an den letzten beiden Lebenstagen deutlich zu erkennen.

In Versuch 4 endlich findet im Gegensatz zu Versuch 1 bis 3 ein beträchtliches Ansteigen der Stickstoffausscheidung, ein regelrechter prämortaler Eiweißzerfall statt. Nun sind gerade bei Hunden sehr häufig versprengte Schilddrüsenkeime vorhanden; in einer jüngst veröffentlichten anatomischen Arbeit von *Huguenin*[3]) wurden 154 Hunde daraufhin untersucht und bei 77 wurden solche versprengte Keime gefunden. So wäre es möglich, daß sowohl in unserem Falle, als auch in anderen unstimmigen Fällen, wo nach Schilddrüsenexstirpation keine thyreopriven Erscheinungen nachweisbar sind, die versprengten Keime vikariierend für das entfernte Schilddrüsengewebe eintreten.

[1]) *Hári*, a. a. O., S. 152.
[2]) *Schultz* und *Mangold*, Pflügers Arch. 114, 420.
[3]) *Huguenin*, Archiv für Tierheilkunde 68, 26 bis 30; zitiert nach Péterfis Ber. ü. d. wiss. Biol. 1, 47.

Wenn wir nun das Ergebnis unserer Versuche besprechen wollen, so läßt sich folgendes sagen. Bei unseren schilddrüsenlosen Hunden 1 bis 3 blieb der typische prämortale Eiweißzerfall aus. Nach *Hári*[1]) soll auch am Normalhund das Ausbleiben des prämortalen Eiweißzerfalls die Regel sein in solchen Fällen, wo die Lebensdauer des hungernden Tieres eine besonders lange ist[2]). Überblicken wir die Lebensdauer in unseren Versuchen und jenen von *Mangold*, so ergibt sich das folgende Verhältnis. Unsere Hunde 1 und 2, bei welchen kein prämortaler Anstieg der Stickstoffausscheidung auftrat, starben am 20. bzw. 30. Hungertag. Bei *Mangolds* Hund 1 und 2 und bei unserem Hund 4, bei welchem ein prämortäler Eiweißzerfall vorhanden war, trat der Hungertod am 23. (*Mangolds* Hund 1), am 28. (*Mangolds* Hund 2) und am 31. Hungertag (unser Hund 4) ein. Sollte nun auch die erwähnte Annahme, wonach die Lebensdauer mit der Größe der Stickstoffausscheidung in den letzten Lebenstagen in direktem Zusammenhang steht, zutreffen, so ist, wie die oben angeführten Zahlen zeigen, die Lebensdauer in unseren Versuchen 1 und 2, in welchen der prämortale Anstieg ausblieb, jedenfalls innerhalb jener Grenze, in welcher noch das Auftreten eines prämortalen Eiweißzerfalls möglich ist.

Vergleichen wir nun unsere vier Versuche mit den *Mangold*schen vier Versuchen, so sehen wir, daß bei allen Hunden von *Mangold*, sowohl bei den zwei normalen, als auch bei den zwei schilddrüsenlosen, welche längere Zeit vor dem Versuch operiert wurden, ein mächtiger prämortaler Eiweißzerfall auftrat. Von unseren vier schilddrüsenlosen Hunden, bei denen wir den von uns bemängelten Umstand der *Mangold*schen Versuchsanordnung ausschalteten, starben drei ohne prämortalen Anstieg der Stickstoffausscheidung, zeigten also ein ähnliches Ver-

---

[1]) *Hári*, a. a. O., S. 165.

[2]) Im Zusammenhang mit der Frage des prämortalen Eiweißzerfalls am Normaltier möchten wir hier auf einen offenbaren Irrtum in der diesbezüglichen Zusammenstellung von *Hári* (a. a. O., S. 156) hinweisen. *Hári* führt dort einen Versuch von *Schöndorff* an (Pflügers Arch. **67**, **395**), in welchem der prämortale Anstieg bei einem am 38. Hungertage auftretenden Hungertode fehlen soll. Wenn wir nun die betreffende Tabelle *Schöndorffs* betrachten (S. 432), so fällt zunächst schon auf, daß in derselben nichts von einem Hungertode vermerkt ist und die letztgemessene Temperatur (36,5° C) eine höhere ist, als gewöhnlich beim Lebensende durch Hunger vorzukommen pflegt. In der Besprechung des Versuchs schreibt aber *Schöndorff* wörtlich (S. 435): „Die Annahme, daß auch mein Hund während des Hungers wasserreicher geworden war, wurde durch die Wasserbestimmung im *getöteten* Tiere bestätigt". Da wir *Schöndorff* kaum zumuten dürfen, ein bereits hungertotes Tier getötet zu haben, bleibt uns nichts anderes übrig, als anzunehmen, daß das Tier keinen Hungertod starb und somit dieser Versuch kaum als Beweis dafür angeführt werden kann, daß auch normale Tiere sehr oft ohne prämortale Eiweißzersetzung sterben.

halten wie die schilddrüsenlosen Kaninchen in den früheren Versuchen von *Mansfeld* und *Hamburger*.

So glauben wir den *Mangold*schen Versuchen keine Beweiskraft gegen die Rolle der Schilddrüse bei dem prämortalen Eiweißzerfall einräumen zu können.

Zusammenfassung.

1. Versuche an schilddrüsenlosen Hunden von *Mangold* führten zu entgegengesetztem Ergebnis als die früheren Versuche von *Mansfeld* und *Hamburger* am Kaninchen. In den *Mangold*schen Versuchen wurde jedoch nicht berücksichtigt, daß beim Hunde die Ausfallserscheinungen nach der Schilddrüsenexstirpation nur im ersten Monat ausgeprägt sind.

2. In unseren Versuchen an schilddrüsenlosen Hunden, in welchen der Hungertod im ersten Monat nach der Operation auftrat, blieb in drei Fällen von vier Versuchen der prämortale Eiweißzerfall entweder völlig aus (Versuch 1 und 2) oder war er ein geringer (Versuch 3).

3. In einem Falle von vier Versuchen stieg die Stickstoffausscheidung prämortal an, dies dürfte vielleicht auf vikariierender Funktion versprengter Schilddrüsenkeime beruhen, welche beim Hunde äußerst häufig vorhanden sind.

4. Demnach werden die Versuche von *Mansfeld* und *Hamburger* durch jene von *Mangold* nicht widerlegt.

Die Schwankungen in den Abbauwerten endokriner Organe und die daraus folgernde Notwendigkeit mehrfacher Untersuchungen.

Von

Hans Rinck.

(Aus der Universitätshautklinik in Jena.)

(Eingegangen am 6. Oktober 1926.)

Mit Hilfe der *Abderhalden*schen Reaktion hat man einen Einblick in die Funktionsstörungen innersekretorischer Drüsen zu gewinnen vermocht. *Der Arbeit liegt die Aufgabe zugrunde festzustellen, ob eine einmalige Untersuchung auf Abbaustoffe endokriner Drüsen deren Funktion widerspiegelt, oder ob mehrere zeitlich eng zusammenliegende Prüfungen nötig sind*, um ein Bild vom wahren Funktionszustand der Drüsen zu gewinnen. Man weiß zur Genüge, daß bei einer Reihe biologischer Untersuchungen *eine* Probe nicht ausreicht, wenn die Funktion eines Organs nicht unter der schweren dominierenden Einwirkung einer Noxe steht. Zur Erläuterung seien die Verhältnisse bei den morphologischen Blutuntersuchungen herangezogen. Es ist bekannt, daß das Blutbild nicht immer den gleichen Aufbau zeigt, sondern daß fortwährende Änderungen in der Zusammensetzung, sogenannte Schwankungen, auftreten. So ist es ganz unmöglich, aus einer einmaligen Blutuntersuchung einen Einblick in die Funktion des blutbereitenden Apparats eines Individuums zu gewinnen. Es sind vielmehr mindestens vier Proben an einem oder an aufeinanderfolgenden Tagen erforderlich. Es gilt diese dringende Forderung für Gesunde sowohl wie für Kranke, vorausgesetzt, daß die Noxe nicht so schwer auf die Funktion der blutbildenden Organe einwirkt, daß der normale Funktionsablauf ganz und ständig unterbunden ist (z. B. Typhus). Bei vielen krankhaften Vorgängen, bei denen die blutbereitenden Organe auch in eine Reaktion eintreten, ist die Einwirkung aber nicht so beherrschend, daß eine gleichbleibende Alteration die Folge ist, z. B. die Änderungen des Blutbildes bei den Dermatosen oder bei der Syphilis. Will man das für diese Erkrankungen charakteristische Blutbild feststellen, so sind, wie gesagt, vier Untersuchungen als Mindestmaß nötig [*Spiethoff*[1])]. Diese Tatsachen veranlaßten Prof. *Spiethoff*,

[1]) *Spiethoff*, Zur Methode der Blutuntersuchungen und Mitteilungen über fortlaufende Blutuntersuchungen an Gesunden. Fol. haematol. **32**, 1926; Arch., H. 4, S. 325.

mich mit systematischen Untersuchungen in derselben Richtung bei den Funktionsprüfungen der endokrinen Drüsen zu beauftragen; diese wichtige Frage der Schwankungen zu klären, war als methodische Vorarbeit dringend erforderlich. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der interferometrischen Methode und mit den Organsubstraten (Opzimen) nach *P. Hirsch* ausgeführt.

Wie bei den Blutuntersuchungen, so ergab sich auch für die *Abderhalden*schen Abbaureaktionen der innersekretorischen Drüsen die erwartete wichtige Tatsache, daß bei diesen Untersuchungen einmalige Abbauergebnisse nur einen bedingten Wert haben. *Es ist von der allergrößten Bedeutung, auf die Schwankungen zu achten, die bei wiederholten Untersuchungen bestehen können.* Wie bei den Blutuntersuchungen kann man so vorgehen, daß am selbigen Tage drei bis vier Proben Blut entnommen werden, oder man kann sie auf einzelne Tage verteilen. Die Wiederholungsuntersuchungen erfolgten meist mit Rücksicht auf die Patienten in mehrtägigem Intervall. Wie bedeutend hierbei die Schwankungen sein können, erläutern die Werte der Tabelle. Von besonderer Wichtigkeit ist, daß ebensolche größeren Schwankungen am gleichen Tage auftreten können.

Mit Rücksicht auf die Tabelle ist folgendes zu beachten: Selbst die einwandfreiesten Organsubstrate (Opzime) enthalten noch unspezifisches Material, wie Bindegewebe usw., das mit in unspezifische Reaktion zu treten vermag. Dieser Umstand ließ eine Fehlergrenze bis 6 Proz. Abbau als gerechtfertigt erscheinen. Die Vorschriften von *Abderhalden* und *P. Hirsch* wurden bei der Ausführung der Versuche strengstens eingehalten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es beim Studium *Abderhalden*scher Abbauvorgänge am innersekretorischen Apparat von grundlegender Bedeutung ist, am gleichen Individuum öftere, mindestens aber drei Untersuchungen vorzunehmen, um jegliche Zufallsschwankungen auszuschalten. Einen serologischen Abbau innersekretorischer Drüsen kann man als einwandfrei und typisch für die betreffende Person oder Erkrankung annehmen, wenn er in allen vorgenommenen Untersuchungen zur Beobachtung gelangt. Eine Frage, die noch der Klärung bedarf, ist die, ob einmalige oder wiederholte höhere Abbauwerte, denen bei den anderen gleichen Proben oft besonders niedrige Werte entsprechen, eine Bedeutung haben, oder ob eine solche erst dann anzunehmen ist, wenn alle Untersuchungen oder der Durchschnittswert aus allen Untersuchungen erhöht sind.

Fehlerquellen, wie Seruminfektion, Autolyse usw., die einmalige hohe Abbauwerte zur Folge haben könnten, schließen wir mit Sicherheit aus.

Abbauergebnisse.

		Schilddrüse Proz.	Thymus Proz.	Nebenniere Proz.	Hoden Proz.	Ovarium Proz.	Hypophyse Proz.
1. Frl. *M. R.*, 22 J. Frische *Gonorrhoe*	1.	3,98	0,995	2,985	—	2,985	1,99
	2. Folgender Tag, früh .	*6,965*	0,995	1,99	—	*8,955*	0
	3. „ „ abends	5,97	2,985	*10,945*	—	*9,95*	5,97
	Durchschnitt:	5,7	1,7	5,3	—	*7,3*	—
2. Fr. *K. Kr.*, 38 J. Unbeh. *Gonorrhoe*	1.	*9,95*	5,97	4,975	—	1,99	2,985
	2. Nach 3 Tagen	*10,945*	*9,95*	0,995	—	*7,96*	5,97
	2. „ 4 „	*9,95*	4,975	2,985	—	1,99	2,985
	Durchschnitt:	*10,3*	*7,0*	3,0	—	4,0	4,0
3. Frl. *P. S.*, 20 J. *Abgeheilte Lues*	1. Morgens	2,985	0,995	1,99	—	0,995	—
	2. Mittags	5,97	0,995	3,98	—	*8,955*	—
	3. Abends	*6,965*	0,995	0,995	—	*12,935*	—
	4. Nächster Tag, mittags	3,98	5,97	2,985	—	1,99	—
	5. „ „ abends	4,975	3,98	4,975	—	0,995	—
	Durchschnitt:	5,0	2,6	3,0	—	5,2	—
4. Herr *Fr. K.*, 15½ J. Chronisch nässendes, teils crustöses, teils squamöses *Ekzem* des Kopfes, Gesichts und der Arme, papulöses an Stamm und Oberschenkel	1.	1,99	0	0,995	*11,94*	—	0,995
	2. Nach 5 Tagen . . .	1,99	3,98	*6,965*	*20,895*	—	2,985
	3. „ 7 „ . . .	3,98	2,985	4,975	*7,96*	—	0,995
	Durchschnitt:	2,7	2,3	4,3	*13,7*	—	1,7
5. Herr *A. Th.*, 34 J. Akut papulo-vesiculöses nässendes *Ekzem*, besonders der Hände, Unterarme und Unterschenkel, weniger an Hals und Stirn	1.	*8,955*	3,98	2,985	*10,945*	—	2,985
	2. Nach 5 Tagen	4,975	—	3,98	*6,965*	—	1,99
	3. „ 8 „	*8,955*	0,995	3,98	*6,965*	—	2,985
	Durchschnitt:	*7,7*	2,5	3,7	*8,3*	—	2,7
6. Herr *W. Br.*, 43 J. *Ichthyosis* am Bein	1.	*9,95*	3,98	—	3,98	—	—
	2. Nach 2 Tagen . . .	*9,95*	4,975	2,985	4,975	—	3,98
	3. „ 3 Wochen . .	*12,935*	2,985	4,975	0,995	—	5,97
	Durchschnitt:	*11,0*	4,0	4,0	3,3	—	5,0

Abbauergebnisse (Fortsetzung).

		Schilddrüse Proz.	Thymus Proz.	Nebenniere Proz.	Hoden Proz.	Ovarium Proz.	Hypophyse Proz.
7. Frl. *H. Pf.*, 20 J. Frische *Gonorrhoe*	1.	1,99	0	0,995	—	1,99	1,99
	2. Nächster Tag	3,98	2,985	1,99	—	4,975	5,97
	3. Nach 3 Tagen . . .	5,97	1,99	3,98	—	*8,955*	1,99
	Durchschnitt:	4,0	1,7	2,3	—	5,3	3,3
8. Frl. *Fr. B.*, 24 J. Unbeh. *Gonorrhoe*	1.	4,975	4,975	2,985	—	*6,965*	4,975
	2. Nach 8 Tagen . . .	5,97	*6,965*	1,99	—	*10,945*	0,995
	3. „ 13 „ . . .	2,985	0	1,99	—	*6,965*	2,985
	Durchschnitt:	4,7	4,0	2,3	—	*8,3*	3,0
9. Frl. *E. B.*, 19 J. *Psoriasis* vulgaris guttata, behaarter Kopf, obere u. untere Extremitäten	1.	*15,92*	*8,955*	4,975	—	2,985	—
	2. Nach 8 Tagen . . .	*13,93*	1,99	*7,96*	—	4,975	—
	3. „ 10 „ . . .	*14,925*	3,98	2,985	—	4,975	—
	Durchschnitt:	*15,0*	5,0	5,3	—	4,3	—
10. Herr *A. L.*, 58 J. Subakutes vesiculöses *Ekzem* der Unterarme und Finger, Hals und Gesicht	1.	4,975	3,98	1,99	*11,94*	—	—
	2. Nach 10 Tagen . . .	*16,915*	5,97	4,975	*8,955*	—	—
	3. „ 12 „ . . .	*7,96*	2,985	3,98	*12,935*	—	—
	Durchschnitt:	*10,0*	4,3	3,7	*11,3*	—	—
11. Herr *R. M.*, 30 J. Chronisch nässendes univers. *Ekzem*	1.	*12,935*	3,98	*10,945*	0,995	—	—
	2. Nach 2 Tagen . . .	*7,96*	4,975	2,985	5,97	—	—
	3. „ 6 „ . . .	*8,955*	4,975	0	*7,96*	—	—
	Durchschnitt:	*10,0*	4,7	4,7	5,0	—	—
12. Herr *R. Schl.*, 46 J. Chronisch näss. *Ekzem* an Achsel, Ellbeugen, Rücken und Abdomen	1.	5,97	*8,955*	4,975	*16,915*	—	—
	2. Nach 10 Tagen . . .	3,98	*13,93*	1,99	*10,945*	—	—
	3. „ 14 „ . . .	*7,96*	2,985	2,985	*8,955*	—	—
	Durchschnitt:	*6,0*	*8,7*	3,3	*12,3*	—	—
13. Herr *M. B.*, 26 J. Akutes nässendes und vesiculöses *Ekzem* der Hände, Füße und des Gesichts	1.	*11,94*	4,975	5,97	3,98	—	—
	2. Nach 4 Tagen . . .	*9,95*	1,99	0,995	2,985	—	—
	3 „ 5 „ . . .	*8,955*	5,97	2,985	*6,965*	—	—
	Durchschnitt:	*10,3*	4,3	3,3	4,7	—	—

Abbauergebnisse (Fortsetzung).

		Schilddrüse Proz.	Thymus Proz.	Nebenniere Proz.	Hoden Proz.	Ovar Proz.	Hypophyse Proz.
14. Frl. *E. R.*, 19 J. Frische *Gonorrhoe*	1. Morgens	3,98	2,985	0,995	—	1,99	0
	2. Mittags	0,995	2,985	0	—	*17,91*	1,99
	3. Abends	0,995	4,975	0,995	—	5,97	0
	Durchschnitt:	2,0	3,7	0,7	—	*8,7*	0,7
15. Herr *Fr. Schm*, 39 J. *Seborrhoisches Ekzem* des Kopfes, Gesichts, Brust, Bauch u. Genitale	1. Morgens	*6,965*	3,98	1,99	*13,93*	—	1,99
	2. Mittags	*9,95*	5,97	4,975	*9,95*	—	0,995
	3. Abends	*14,925*	5,97	3,98	*8,955*	—	2,985
	Durchschnitt:	*10,7*	5,3	3,7	*11,0*	—	2,0
16. Frl. *M. Fr.*, 22 J. Chron. *Ekzem* an Hals, Gesicht, Kopf, Arm und After	1. Morgens	*9,95*	3,98	0,995	—	*19,9*	2,985
	2. Mittags	*7,96*	5,97	4,975	—	*11,94*	1,99
	3. Abends	*14,925*	*10,945*	3,98	—	*16,915*	0,995
	Durchschnitt:	*11,0*	*7,0*	3,3	—	*16,3*	2,0
17. Frl. *H. R.*, 19 J. Unbeh. *Gonorrhoe*	1. Morgens	*9,95*	3,98	1,99	—	4,975	1,99
	2. Mittags	*10,945*	4,975	2,985	—	1,99	1,99
	3. Abends	*11,94*	5,97	4,975	—	*6,965*	3,98
	Durchschnitt:	*11,0*	5,0	3,3	—	4,7	2,7
18. Frl. *M. M.*, 17 J. Frische *Gonorrhoe*	1. Morgens	*8,955*	4,975	2,985	—	*16,915*	0,995
	2. Mittags	2,985	3,98	3,98	—	*6,965*	0,995
	3. Abends	3,98	4,975	0,995	—	2,985	0
	Durchschnitt:	5,3	4,7	2,7	—	*9,0*	0,7
19. Herr *K. J.*, 26 J. Unbeh. *Gonorrhoe*	1. Mittags	*10,945*	*6,965*	2,985	0,995	—	3,98
	2. Nächster Morgen	3,98	4,975	5,97	*8,955*	—	1,99
	3. Nächster Mittag	*12,935*	4,975	3,98	*6,965*	—	2,985
	Durchschnitt:	*9,3*	5,7	4,3	5,7	—	3,0
20. Herr *H. R.*, 23 J. *Normalfall*	1.	2,985	0,995	2,985	5,97	—	0,995
	2. Nächster Tag	0,995	*6,965*	3,98	*8,955*	—	1,99
	3. Übernächster Tag	5,97	4,975	2,985	4,975	—	7,96
	Durchschnitt:	3,3	4,0	3,3	*6,7*	—	3,7

Ein Beitrag zur Methodik des Löwe-Zeissschen Interferometers in seiner Anwendung auf Blutuntersuchungen.

Von

Johann Wolfgang Amschler.

(Aus dem Institut für Tierzucht und Züchtungsbiologie der Technischen Hochschule zu München.)

(Eingegangen am 27. Juni 1926.)

I. Prinzip der Methode.

Die Anwendung der Interferometermethode setzt voraus, daß in die Blutbahn der Mutter Placentateilchen gekommen sind, die, weil zwar arteigen, aber blutfremd, dort die Bildung von Abwehrfermenten, und zwar auf Placentaeiweiß eingestellten, proteolytischen Fermenten bewirken, die, im Übermaß gebildet, ins Blutserum abgestoßen werden. Wirkt derart verändertes Serum auf Placentaeiweiß ein, so erfolgt dessen Abbau, und zwar so, daß nach den Gesetzen der Fermentwirkung Beziehungen zwischen Menge des Fermentes, Menge des Substrates, Dauer der Einwirkung und Fermentwirkung bestehen. Es entstehen durch den Abbau Peptone, die löslich sind und die Konzentration des Serums erhöhen, dieses optisch dichter machen, so daß die Fortpflanzungsgeschwindigkeit des Lichtes in der konzentrierteren Probe gegen die Vergleichsprobe kleiner und somit auch beide Brechungsindizes verschieden, der Fortpflanzungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional werden.

Man mißt nun einmal Serum gegen Serum ohne Placenta, und dann Serum gegen Serum, das auf Placenta bei 37,5° C während der Dauer von 24 Stunden eingewirkt hat. Tritt bei letzterem Vergleich eine Verschiebung der Interferenzbilder ein, so ist zunächst auf Änderung der Konzentration zu schließen. Wie die Auswertung dieses Vorgangs für den vorliegenden besonderen Fall zu geschehen hat, wird im folgenden gezeigt.

II. Eigentliche Methodik.

Bevor zur Blutentnahme geschritten wird, sind für jede Probe mindestens eine 2-ccm-Vollpipette und mindestens zwei Kapillar-

pipetten zu 0,5 ccm und fünf Zentrifugiergläschen zu sterilisieren, die entsprechende Anzahl Gummistopfen in etwa 70proz. Alkohol zu legen und die zur Desinfektion des Serums nötige Vucinstammlösung herzustellen. Es ist zweckmäßig, diese Arbeiten vor der Blutentnahme zu erledigen, da man am Orte der Untersuchung wenig oder nie Gelegenheit hat, Sera in der nötigen Anzahl zu gewinnen. Die Zeit während des Transportes zum Laboratorium genügt meist, sofern 5 bis 6 Stunden vergangen sind, zu einer klaren Scheidung von Serum und Blutkuchen.

1. *Sterilisation der Pipetten.* Glasstäbe und Pipetten werden mit gewöhnlichem kalten Leitungswasser gereinigt, mit destilliertem Wasser nachgespült, in Alkohol gelegt und abgebrannt, indem sie einige Male durch die Flamme gezogen werden. Diese Art der Sterilisation ist für vorliegende Zwecke nicht vorteilhaft. Die gut gereinigten und trockenen Pipetten werden in Pergamentpapier gewickelt und etwa 1 Stunde der Temperatur von etwa 150° C ausgesetzt. Es ist hierbei zweckmäßig, das Pergament schwach anzufeuchten, um ein Brechen und Reißen desselben zu verhindern. Zum Verschluß der Umhüllung benutzt man gummierte Papierstreifen.

2. Die *Zentrifugiergläschen* sind, sofern sie Serum oder Blut oder überhaupt leicht gerinnende Substanzen enthielten, mit kaltem Leitungswasser gut auszuspülen; die in dem Spitzenauszug des Röhrchens sich festsetzende pulverförmige Placenta oder auch Blutkörperchen werden zweckmäßig unter Schräghalten des Glases und ständigem Zufließen von kaltem Wasser mit einem dünnen Draht und zuletzt mit einer Feder entfernt. Die mechanische Reinigung ist so lange fortzusetzen, bis an der Stelle, wo Placenta war, gar keinerlei trüber Beschlag der inneren Glaswand festzustellen ist. Sodann erfolgt Nachspülen mit destilliertem Wasser und vorsichtiges, langsames, nicht rasches Trocknen, indem man die Röhren verkehrt und schräg geneigt in die mit Filtrierpapier belegten Gestelle bringt. Die schräge Lage bewirkt ein besseres und schnelleres Trocknen der Gläser, wobei insbesondere auch das in dem fast kapillaren Auszug der Röhrchen zurückgehaltene Wasser verdunstet. Es ist empfehlenswert, nun die Röhrchen mit der Hand überhaupt nicht mehr zu berühren, sondern sie nur mit Klammern zu fassen. Vor der Sterilisation werden die Gläschen nochmals auf ihre Reinheit geprüft. Sie müssen an allen Stellen klar durchsichtig ohne jegliche Trübung und Flecken sein, wie sie hauptsächlich bei schnellem Trocknen entstehen können. Insbesondere ist wieder darauf zu achten, ob an der Stelle, also am Boden und Auszug, wo Placenta oder Blutkörperchen lagen, keinerlei Trübung mehr zu sehen ist. Konzentrierte Chromsäure-Schwefelsäurelösung entfernt den letzten Eiweißfettrest. Meist hinterläßt die Placenta eine fettige, trübe Zone am Glasboden. Die für einwandfrei befundenen Gläser erhalten nun einen Verschluß mit nicht entfetteter Watte so, daß er nicht zu locker aber auch nicht zu fest sitzt (Zusammenpressen der Watte im Röhrchen ist von Nachteil), den Glasrand gut überdeckt und oben gerundet, nicht gespalten ist. Man bringt nun Pipetten in Pergament und Zentrifugierröhrchen mit Watteverschluß in Drahtkörbe und setzt sie 1 Stunde lang einer Temperatur von 150° C aus.

3. Die *Gummistopfen* gibt man zweckmäßig in ein Becherglas, gießt Alkohol darüber und läßt sie 1 bis 2 Stunden stehen, um sie beim Gebrauch entweder mit steriler Zange zu fassen und schnell abzubrennen oder auf angewärmter steriler Glasplatte in Luft zu trocknen, was hauptsächlich

in der Sonne bei der raschen Verdunstung des Alkohols sehr schnell erreicht werden kann. Das Abflammen ist, um Anbrennen zu verhüten, sehr vorsichtig und rasch vorzunehmen. Ich stellte fest, daß abgebrannte Stopfen, nachher auf die Röhrchen gesetzt, in diesen stets Alkohol ausquetschten, die innere Glaswand mit Alkoholdämpfen beschlugen und die Ergebnisse nachteilig beeinflußten. Es ist daher zweckmäßig, den Verschluß auf vorgewärmten, sterilen Glasplatten in der Luft rasch zu trocknen.

Die sterilisierten Gegenstände beläßt man bis zum Gebrauch am besten im Sterilisationsschrank.

4. *Die Herstellung der Vucinstammlösung.* Den später noch zu besprechenden Serumproben von 0,5 ccm wird zur Verhütung der Fäulnis während der Bebrütung eine Vucinlösung (0,025 ccm : 0,5 ccm Serum) 1 : 500 zugesetzt, so daß schließlich im Serum eine Vucinkonzentration 1 : 10000 erreicht wird.

Wenn ein Serum durch Zusatz einer Vucinlösung 1 : 500 auf eine Vucinkonzentration 1 : 10000 gebracht werden soll, muß man zu

10	ccm Serum	0,50	ccm	Vucinlösung	1 : 500
9	,, ,,	0,45	,,	,,	1 : 500
8	,, ,,	0,40	,,	,,	1 : 500
0,5	,, ,,	0,025	,,	,,	1 : 500

zusetzen.

Man wiegt 200 mg Vucinum bihydrochloricum auf der analytischen Wage ab und trägt es vorsichtig in 100 ccm siedendes, destilliertes Wasser ein, wobei ein Überschäumen durch Umrühren mit einem Glasstab verhindert wird. Nachdem es gut gelöst ist, wird bis zur Marke 100 ccm mit siedendem, destilliertem Wasser aufgefüllt und die Vucinstammlösung in eine braune, sterile Flasche aus Jenaer Glas umgefüllt und mit sterilem Verschluß versehen. Die Lösung ist nach Abkühlung gebrauchsfertig, dunkel aufzubewahren und 5 Tage haltbar.

Vorbereitung zur Blutentnahme.

Die zum Auffangen des Blutes bestimmten Röhrchen mit Gummiverschluß werden ebenso sterilisiert wie die Zentrifugierröhrchen. Auch hier ist unbedingte Sauberkeit der Gläser Grundbedingung. Röhrchen mit Flecken infolge zu rascher Trocknung oder mangelhafter Reinigung, Trübungen am Boden sind zur Blutaufnahme nicht geeignet. Sie sind so lange unter Leitungswasser mit der Bürste zu reinigen, bis das Wasser außen und innen überall gleichmäßig abfließt und Trübungen jeder Art verschwunden sind. Die Trocknung ist ebenfalls vorsichtig vorzunehmen und jedes Röhrchen bei seiner Auswahl zum Sterilisieren auf völlige Klarheit zu prüfen.

Das Aufsetzen der Gummistopfen: Man entnimmt die sterilen Gläser (eine Stunde bei 150° C) dem Sterilisationsschrank, läßt abkühlen und bringt sie, mit einer Klammer den Watteverschluß abwärts haltend, in die Flamme, brennt den Verschluß ab, so daß er leicht gebräunt wird (Abflammen), zieht ihn mit der Feuerzange oder sonst einem geeigneten sterilen Werkzeug heraus, immer noch die Öffnung

nach abwärts, und setzt nun den zuvor auf die sterile Glasplatte gebrachten und getrockneten Gummistopfen auf. In der Regel genügt die Zeit des Abbrennens vom Wattebausch und dessen Entfernung aus dem Röhrchen zum Trocknen des Gummiverschlusses. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß der Verschluß mit steriler Zange in Alkohol gefaßt und nachher auch mit der Zange aufgesetzt wird. Eine Berührung der Gläser und Verschlüsse mit den Händen soll womöglich vermieden werden.

Metallgegenstände, wie Zangen und Pinzetten, werden zwecks Sterilisation abgebrannt. Die Hände desinfiziert man durch Waschen mit Wasser, Seife und Bürste, darauf in Desinfektionslösung (Sublimat 1 : 1000 oder Kresolseifenlösung 1 : 100) und nochmals Waschen.

Die Blutentnahme.

In der Blutentnahme liegt für die Methode eine große Fehlerquelle. Es ist alles zu unternehmen, um sie so steril wie nur möglich zu gestalten. Sie soll morgens nüchtern geschehen, und zwar durch Venenpunktion (Vena jugularis). Man entnimmt etwa 10 bis 15 ccm Blut mit trockener steriler Nadel und achtet besonders darauf, daß das Blut nicht quirlt, sondern zügig fließt und am Innenrand des Röhrchens abfließt, um eine Zertrümmerung der Erythrocyten zu verhindern. Der Verschluß wird mit der Hand abgenommen und das Röhrchen nach Aufnahme von etwa 15 ccm Blut sofort geschlossen. Jedes Blutröhrchen wird mit einem Etikett versehen und erhält die laufende Nummer der Liste, worin Name des Gestüts, Name des Tieres, Schlag, Deckdaten, Geschlecht und Tag der Blutentnahme eingetragen werden.

Eine Benetzung des Glasrandes und der äußeren Wand mit Blut wird zweckmäßig mit sterilem Wasser und Alkohol entfernt, nicht aber mit kaltem Leitungswasser, denn dies ist eine neue Quelle für Bakterienverunreinigung, und weiterhin kann das plötzliche Temperaturgefälle von 38^0 auf die Temperatur des kalten Leitungswassers für den weiteren Verlauf der Reaktion ungünstig wirken. Ich habe jeweils negative Resultate damit erreicht.

Um ein möglichst rasches Absetzen der Blutkörperchen und des Blutkuchens zu erreichen, ist es vorteilhaft, den Transportkasten mit Blut an eine kühle Stelle zu bringen. Das Fibrin zieht sich zusammen und preßt das klare Serum von selbst aus. Im Winter erfolgt wegen der niederen Temperatur die Serumausscheidung für gewöhnlich schneller als bei einer durchschnittlichen Sommertemperatur.

Im Laboratorium angekommen, hält man den Transportkasten zunächst noch geschlossen, macht die Zentrifuge gebrauchsfertig und stellt sterile Zentrifugierröhrchen, die noch mit Watte verschlossen sind, auf den Zentrifugierglasgestellen, Drahtkorb mit sterilen Pipetten

in Pergament, Vucinstammlösung in steriler brauner Flasche aus Jenaer Glas, Gummistopfen in Alkohol, Feuerzange, Klammer, Etiketts zur Bezeichnung der Zentrifugierröhrchen, sowie sterile Glasplatten und Placenta bereit.

Das Zentrifugieren der Sera und deren Behandlung bis zur Bebrütung.

1. Man entfernt den oberen Teil der Pergamenthülle einer 2-ccm-Pipette so weit, daß man die Pipette gerade fassen kann, und setzt die sterile Gummikappe auf.

2. Dem Transportkasten wird ein Blutröhrchen entnommen (dies vorsichtig geöffnet, damit etwa daran haftende rote Blutkörperchen und Serum nicht ins klare Serum zurückfließen), und bringt es in das hierfür bereit gestellte Gestell.

3. Ein großer Gummistopfen für das Blutröhrchen und ein kleiner für das Zentrifugierröhrchen werden mit dem oberen breiten Teil mittels steriler Pinzette auf eine angewärmte sterile Platte gelegt und mit einer entsprechend hohen Glasglocke (Petrischale) überdeckt.

4. Abflammen des Watteverschlusses eines Zentrifugierröhrchens, das mit einer Klammer gehalten wird, Watte wird mit Pinzette entfernt.

5. Das Zentrifugierröhrchen bringt man nun in das dafür bestimmte leere Gestell und stellt es schräg.

6. Vorsichtige Öffnung des Blutröhrchens, damit etwa anhaftendes Serum und Erythrocyten nicht in das klare Serum zurückfließen. Sollte doch ein Zurückfließen erfolgen, so ist es nicht immer Ursache bakterieller Verunreinigung oder Hämoglobinverfärbung, die ebenfalls störend wirkt.

7. Der Gummistopfen kommt in ein Becherglas mit kaltem Leitungswasser; die 2-ccm-Pipette wird nun mit der Spitze in das klare Serum geführt und 2 ccm abgehoben. Sollte weniger Serum ausgepreßt worden sein, so ist auf einen Kontrollversuch zu verzichten oder die Probe zurückzustellen, bis genügend Serum davon zur Verfügung steht. Es sei darauf hingewiesen, daß es manchmal schwer gelingt, aus 15 ccm Blut mehr als 1 ccm Serum zu gewinnen. Sollte an der Oberfläche des Serums im Blutröhrchen das Fibrin angeklebt sein, so löst man nicht mit einer ausgeglühten Platinnadel, sondern führt die Pipette rasch an der Glaswand entlang in das klare Serum. Bei einiger Übung kann man in diesem Falle hämoglobinfreies Serum in 1 bis 2 ccm Menge gewinnen.

8. Die Pipette wird nun in das schräg gestellte Zentrifugierröhrchen so entleert, daß der Inhalt an der Glaswand von halber Höhe abläuft. Da es wichtiger ist, das nun im Zentrifugierröhrchen enthaltene Serum steril weiter zu behandeln, wird erst das Röhrchen geschlossen, mit den nun trockenen Gummistopfen, sodann das Blutröhrchen, das für weitere etwa notwendig werdende Kontrollversuche außer der Reihe zurückgestellt wird. Es erfolgt meist noch eine weitere Serumausscheidung.

9. Das Zentrifugierröhrchen erhält nun ein Etikett mit der Nummer des Blutröhrchens und wird nun aufrecht in die hintere Reihe des Gestells gebracht.

In der eben angegebenen Weise werden alle Blutproben zum Zentrifugieren behandelt. Für jede Serumentnahme ist eine frische, sterile Pipette zu nehmen, um nun auch die Luft in der Gummibirne steril zu bekommen. drückt man diese mehrmals zusammen und saugt die Luft durch die Flamme

ein. Jede Pipette wird nicht vollständig, sondern bis zur unteren Marke entleert und nach Gebrauch in eine Schale mit kaltem Leitungswasser gebracht, um ein Anlegen des Serums zu verhindern und die gründliche Reinigung vorzubereiten.

10. Hat man so viele Serumproben umpipettiert, als die Zentrifuge aufnehmen kann, so beginnt man mit dem Zentrifugieren (300 Umdrehungen in der Minute), das im allgemeinen nach 5 bis 10 Minuten beendigt werden dürfte. Die Zentrifugiergläschen werden mit der Pinzette herausgenommen. Proben, die noch trüb sind, eine starke Abscheidung von Blutkörperchen zeigen, sind mit steriler Pipette wie oben angegeben in steriles Zentrifugierglas umzufüllen, mit sterilen Gummistopfen zu verschließen und ein zweites Mal zu zentrifugieren, das so lange fortgesetzt werden muß (gelegentlich sogar fünfmal), bis mit der Lupe am Boden des Gläschens keine Blutkörperchen mehr wahrzunehmen sind. Die gebrauchten Röhrchen sind wie auch die jeweiligen Gummistopfen in kaltes Leitungswasser zu bringen. Man hält dies in Bechergläsern bereit und ersetzt es ab und zu.

Bezüglich der Menge des Zentrifugats ist daran zu denken, daß 1,5 ccm (3 . 0,5) für die Bebrütung nötig sind, daß also im allgemeinen als erste Pipette 2 ccm Serum genommen werden müssen. Während des Zentrifugierens werden die Notizen über Art der Ausscheidung des Serums, ob klar oder trübe, viel oder wenig, ob am Verschluß haftendes Serum mit Blutkörperchen zurückgeflossen ist, ob die Fibrinsäule schon stark zusammengezogen oder dem Glasrand noch angelegen hatte, so daß die Pipette längs der Glaswand entlang geführt werden mußte, um Serum aufsaugen zu können, ob schließlich die ausgeglühte Platinnadel die Fibrinsäule von der Glaswand trennen mußte.

11. Ein weiteres Gestell zur Aufnahme der zur Bebrütung kommenden Sera wird bereitgestellt.

12. Drei sterile Gummistopfen kommen auf eine sterile, angewärmte Glasplatte.

13. Die Pergamenthülle einer 0,5-ccm-Kapillarpipette wird am oberen Ende entfernt, die Pipette mit Pappe versehen.

14. Drei Blutröhrchen (= Zentrifugierröhrchen) werden am Watteverschluß abgeflammt, und dieser mit steriler Pinzette entfernt.

15. Die Blutröhrchen kommen in schräger Stellung in das entsprechende Gestell.

16. Nun wird jedes Röhrchen mit steriler Pipette (am besten für jede Beschickung eine frische Pipette auch bei ein und derselben Probe) mit 0,5 ccm Serum beschickt, wobei man mit der Spitze der Pipette bis zum Auszug des Zentrifugierröhrchens geht. Die Pipetten legt man nach Gebrauch in kaltes Leitungswasser.

17. Jeder Serumprobe von 0,5 ccm sind nun 0,025 ccm Vucinlösung mit Kapillarpipette zuzufügen.

18. Zwei Proben werden sofort mit sterilen Gummistopfen verschlossen, die dritte behält aus einer zugeschlossenen Ampulle 0,5 mg Placenta und wird ebenfalls steril verschlossen. Alle drei Proben werden nun fest geschüttelt, mit Etiketten und der Nummer des Blutröhrchens versehen. Stellt man Parallelversuche an, so sind von ein und derselben Blutprobe die entnommenen Serummengen getrennt für sich zu behandeln und die Zugehörigkeit außer mit laufender Nummer mit Buchstaben zu bezeichnen, z. B.:

Blutprobe 4.

Serumprobe 4a	Serumprobe 4b	
1. Zentrifugierröhrchen 4a	„	4b
2. Zentrifugierröhrchen 4a′ (falls ein mehrmaliges Zentrifugieren notwendig ist) . . .	„	4b′
3. Zentrifugierröhrchen 4a″	„	4b″
usw.		
Blutröhrchen 4a mit 0,5 ccm Serum + 0,025 ccm Vucin	„	4b
Blutröhrchen 4a mit 0,5 ccm Serum + 0,025 ccm Vucin	„	4b
Blutröhrchen 4a mit 0,5 ccm Serum + 0,025 ccm Vucin	„	4b
+ 5 mg Placenta.		

Die Proben 4a und 4b dürfen, obwohl sie einer Blutprobe entstammen, nicht gegenseitig ausgemessen werden, da durch geringe Verdunstung beim Umpipettieren höhere oder tiefere Schicht des Serums im Blutröhrchen verschiedene Konzentrationen aufweisen können. Für die Ausmessung im Interferometer gilt immer nur ein bestimmtes Zentrifugat, dessen Proben untereinander in bezug auf eine Eigenschaft verglichen werden können.

19. Der Brutschrank ist so zeitig zu heizen, daß er, sobald die ersten drei Vergleichsproben verschlossen sind, damit beschickt werden kann. Es empfiehlt sich auch hier, die Serumröhrchen in ein Gestell zu bringen.

20. Die Temperatur des Brutschrankes ist auf 37,5° C zu halten und die Sera 24 Stunden lang der Bebrütung auszusetzen. Sofern elektrische Brutöfen nicht zur Verfügung stehen, ist an dem mit Gasheizung ein Wärmeschutz aus Pappe anzubringen. Er soll in einem Raume aufgestellt werden, wo möglichst wenig Zugluft herrscht.

21. Während das Serum der Bebrütung ausgesetzt ist, werden sämtliche Pipetten, Gummistopfen und Bechergläser, sowie Blut- und Zentrifugierröhrchen wie eingangs angegeben gereinigt und die 0,5-ccm-Pipetten und sofern sie für die Serumröhrchen im Brutschrank nicht ausreichen auch die 1-ccm- und 2-ccm-Vollpipetten sterilisiert. Für jedes Serumgläschen muß zum Ausmessen eine sterile Pipette zur Verfügung stehen. Die Gummistopfen werden mit gewöhnlichem Filtrierpapier abgetrocknet und in einer Pappschachtel kühl aufbewahrt.

Das Ausmessen der Sera.

Der Akkumulator ist so rechtzeitig zu prüfen, daß er zu Beginn der Messung mit genügender Spannung zur Verfügung steht. Um sich von Zufälligkeiten der Spannungsänderungen unabhängig zu machen, ist es empfehlenswert, das Interferometer durch Vorschaltwiderstände unmittelbar mit der elektrischen Zimmerleitung (Steckkontakt) zu verbinden.

Zur interferometrischen Ausmessung sind folgende Geräte benötigt:

1. Die 1-mm-Kammer.
2. Für je ein Serumröhrchen eine sterile Pipette.
3. Vollpipetten mit Gummibirne zum Aussaugen bzw. Reinigen der Kammer.
4. Physiologische Kochsalzlösung.
5. Destilliertes Wasser.
6. Ein Becherglas mit destilliertem Wasser.
7. Weite Bechergläser mit kaltem Leitungswasser zur Aufnahme der entleerten Serumröhrchen.
8. Eine Schale mit kaltem Leitungswasser zur Aufnahme der gebrauchten Pipetten.
9. Ein Holzstäbchen mit Filtrierpapier, wenig faserndem Stoff und dünnem Hirschleder zum Reinigen (Austupfen) der Kammer.

1. Die Messung wird bei gewöhnlicher Zimmertemperatur vorgenommen. Man entnimmt die Proben nach genau 24 Stunden dem Brutschrank und schüttelt kräftig, um das an der inneren Glaswand und am Verschluß haftende Kondenswasser dem Serum zurückzugeben. Unterbleibt das Umschütteln, so tritt lediglich durch, wenn auch noch so geringe Verdunstung, Konzentrationsänderung ein, das Spektrum wird abgelenkt, der Versuch ist unbrauchbar. Andererseits kann es sein, daß bakterieller Abbau erfolgt ist, der *negative* Ausschläge hervorruft. Durch die Verdunstung ist die Verdünnung kompensiert worden, es gibt Werte nahe um die Nullage oder überhaupt keine Verschiebung. Es ist leicht einzusehen, daß auch in diesem Falle der Versuch ausschalten muß.

2. Nach dem Schütteln wird zunächst stark zentrifugiert, um völlig klare Sera zu erhalten, insbesondere bei Placentazusatz.

3. Der Temperiertrog des Interferometers ist mit destilliertem Wasser zu füllen, das Osramlämpchen mit dem Akkumulator zu verbinden und die Stromquelle einzuschalten.

4. Nun wird die Nullage des Interferometers bestimmt, d. h. die Teilstrichzahl ermittelt, der Koinzidenz der Maxima und Minima nullter Ordnung entspricht.

5. Die Wasserkammer wird so eingesetzt, daß die Aufschrift „Carl Zeiss, Jena“ vorne links sich befindet.

6. Die rechte Kammerhälfte wird nun unter Zuhilfenahme einer sterilen Kapillarpipette mit einer Serumprobe ohne Placentazusatz als Vergleichslösung gefüllt. Hierbei genügen 0,25 ccm. Die Lösung

mit niedriger Konzentration kommt stets auf die Seite der feststehenden Kompensatorplatte, also auf die rechte Seite.

7. Die linke Kammerhälfte nimmt das Serum auf, das auf Placenta 24 Stunden lang eingewirkt hat. Beim Abheben dieses Serums mit steriler Pipette ist darauf zu achten, daß keinerlei Placentateilchen mitgerissen werden. Dies verhütet man am besten dadurch, daß man die Pipettenspitze stark unterhalb des Auszuges vom Serumröhrchen und dem mittleren Teil der Pipette am entgegengesetzten Teil des Randes oben anlegt oder andrückt und nun etwa 0,25 ccm entnimmt.

8. Nun wird in die Kammer die 4-mm-Platte eingesetzt, indem sie an dem gerieften Nickelteil gefaßt und über den Führungsstift geführt wird. Hierbei ist darauf zu achten, daß in keiner der beiden zu untersuchenden Flüssigkeiten Luftbläschen auftreten. Diese werden durch nochmaliges Heben und Senken der Einsatzplatte entfernt.

9. Die Flüssigkeit mit veränderter Konzentration, hier also mit höherer Konzentration, ist stets auf die Seite der beweglichen Kompensatorplatte, also auf die linke, die Trommelseite, zu bringen.

10. Um Niederschläge von Kondenswasser an den Glasfenstern der Wasserkammern zu verhindern, hält man die Temperatur des Temperierbades *unter* der des Untersuchungsraumes. Eine Abstimmung der Temperaturen von Temperierbad und zu untersuchenden Flüssigkeiten und der Umgebung ist zur Durchführung der Interferometermethode bei Untersuchung homologer Flüssigkeiten nicht geboten. Der Temperaturausgleich der Flüssigkeiten und Kammer untereinander ist zu einer vollgültigen Messung ausreichend.

11. Beobachtet man gleich nach Einhängen der Wasserkammer, so wird man zunächst ein schlieriges Ineinanderfließen, Schrägstellung, Verbiegung der Interferenzen wahrnehmen können. Diese Erscheinung ist auf den Temperaturaustausch zwischen Temperierbad, Lösungen und Kammer zurückzuführen. Der Ausgleich ist infolge der sehr günstigen Bauart der Kammer und der Metallvergoldung nach 3 bis 5 Minuten vollzogen.

12. Sollte die Trennung der beiden Spektren nicht durch die übliche schwarze feine Linie erfolgen, sondern das untere zum Teil in der oberen Hälfte verdunkelt sein, so ist das das Zeichen dafür, daß am unteren Teil der Wasserkammer eine Luftblase hängt, die leicht abgestreift werden kann.

13. Zum Eintragen der Ergebnisse wird eine Liste geführt mit folgenden Spalten: Besitzer, laufende Nummer, Name des Tieres,

Schlag, Farbe, Tag der Blutentnahme, vermutliche Trächtigkeitsdauer, Ausschlag des Interferometers bei Serum gegen Serum + Placenta, gegen Serum allein, Differenz und Richtung (letztere durch Vorzeichen). Unter negativer Reaktion versteht man hierbei Werte, die unter Null liegen, dies entspricht einer Verdünnung. Sie sind für unsere Zwecke unbrauchbar.

14. Das Maß der Verschiebung des oberen Spektrums, an der Trommel abgelesen, wird, mit Vorzeichen versehen, notiert.

15. Bezüglich der genauen Einstellung sei darauf hingewiesen, daß Blau am wenigsten, Rot am weitesten abgelenkt wird. Dies ist besonders bei der Ausmessung kolloidaler Flüssigkeiten zu berücksichtigen, da in diesen Fällen das obere Streifensystem oft an Helligkeit verliert und selbst die Minima und Maxima nullter Ordnung undeutlich werden. Die richtige Einstellung ist stets dann getroffen, wenn am rechten schwarzen Minimumstreifen Blau außen, Rot innen und am linken Minimumstreifen außen Violett und innen ein schwachroter Saum auftritt. Geht man mit dem Auge am Okular hin und her, so dürfen sich bei richtiger Einstellung die Minimasäume nicht verbreitern oder schmäler werden.

16. Um nun die Kammer mit der Serumprobe zu beschicken, die nicht auf Placenta eingewirkt hat, nimmt man zunächst die 4-mm-Platte heraus; die Kammer selbst bleibt im Temperiertrog. Die Platte wird zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült, sodann mit destilliertem Wasser und mit Filtrierpapier und einem dünnen Hirschlederläppchen gut getrocknet. Nach Herausnahme der 4-mm-Platte wird die rechte Hälfte der Kammer, die also das Vergleichsserum enthält, mit einem dem Interferometer beigegebenen Glasdeckel abgedeckt, um Verdunstungsverluste zu vermeiden.

17. Die linke Kammerhälfte wird unter Zuhilfenahme einer Pipette mit Gummibirne entleert, mit physiologischer Kochsalzlösung und dann mit destilliertem Wasser nachgespült und mit Filtrierpapier, einem Holzstäbchen und wenig faserndem, die Glasplatten nicht ritzendem Läppchen trockengerieben.

18. Nun gibt man in die linke Kammerhälfte die Kontrollprobe Serum, das nicht auf Placenta eingewirkt hat, wartet den Temperaturausgleich ab und mißt aus, nachdem das Interferometer zuvor wieder auf die Nullage gebracht worden ist. Ist auch hier bei der Ausmessung Serum gegen Serum, beides ohne Placenta, eine Konzentrationsänderung eingetreten, so ist der Versuch unbrauchbar.

19. Die Reinigung der Kammer geschieht in der unter Punkt 17 angegebenen Weise. Es ist zu beachten, daß Papier- und Stoffasern

und jede Trübung der Kammergläser und der Einsatzplatte beseitigt werden müssen, um Meßfehlern vorzubeugen. Glasstäbe und Messer dürfen nicht benutzt werden, das Filtrierpapier, das Tuch- oder Lederläppchen ist jeweils um ein Holzstäbchen zu legen.

Alkohol, Xylol und andere harzlösende Stoffe dürfen zur Reinigung nicht verwendet werden, da sie den Kitt lösen, der die Glasplatten mit der Kammer verbindet.

Die Pipetten und Serumröhrchen sind in kaltes Leitungswasser zu legen und nach dem Ausmessen sofort zu reinigen, insbesondere jene Serumröhrchen, die Placentapulver enthielten.

Photoaktivitätsstudien.

VII. Mitteilung: Blutzuckerwirkung ungesättigter Fettsäuren.

Von

S. Lee (Korea).

(Aus dem Kaiserin-Auguste-Victoria-Haus.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In der dritten Mitteilung dieser Arbeitsreihe haben wir gemeinsam mit *Vollmer* die hyperglykämische Wirkung zahlreicher Substanzen beschrieben, denen eine reduzierende Wirkung auf die photographische Platte gemeinsam ist. Es handelte sich fast durchweg um organische Produkte, besonders um tierische und pflanzliche Öle, die chemisch keine Einheit darstellen. Um den Wirkungsmechanismus dieser komplexen Stoffe zu analysieren, haben wir im folgenden die Blutzuckerwirkung einiger chemisch reiner Substanzen studiert, die der Gruppe der ungesättigten Fettsäuren angehören und Bestandteile einiger der früher untersuchten Produkte darstellen.

Wir untersuchten die durch Kohlenstoffdoppelbindungen charakterisierten, ungesättigten Fettsäuren *Leinölsäure*, *Oleinsäure* und *Ricinolsäure*, die teils schon in unbestrahltem Zustand, in erhöhtem Maße aber nach Ultraviolettbestrahlung die Eigenschaft haben, auf photographischen Platten entwickelbare Effekte zu erzeugen. 1 bis 2 ccm dieser Fettsäuren wurden Kaninchen subkutan injiziert, der Blutzuckergehalt vorher und fortlaufend nach der Injektion nach der Methode von *Hagedorn-Jensen* bestimmt. In allen Einzelheiten hielten wir uns an die früher angegebene Versuchsanordnung. Es wurden

jeweils am gleichen Tiere Paralleluntersuchungen mit bestrahlten und unbestrahlten Substanzen vorgenommen.

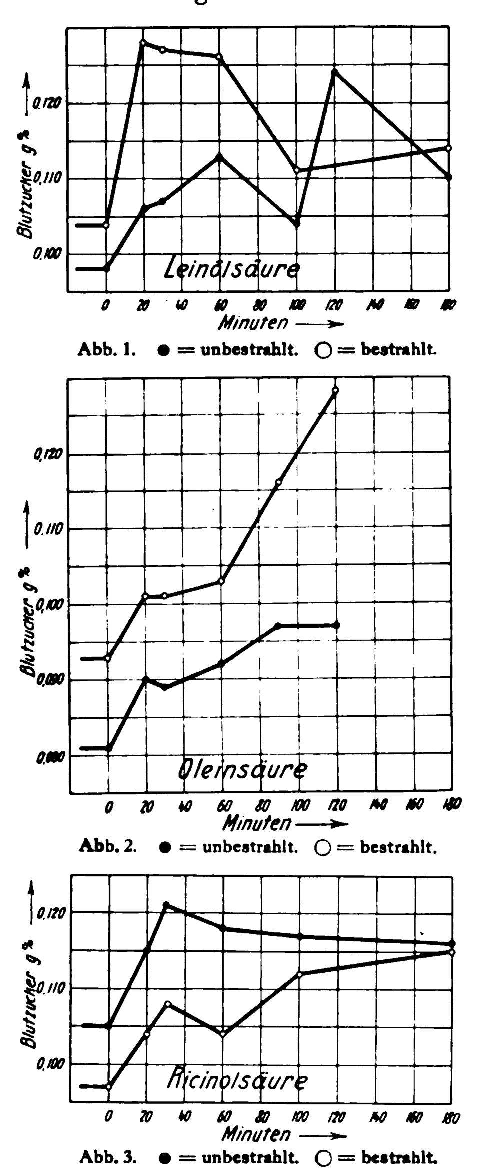


Abb. 1. ● = unbestrahlt. ○ = bestrahlt.

Abb. 2. ● = unbestrahlt. ○ = bestrahlt.

Abb. 3. ● = unbestrahlt. ○ = bestrahlt.

Die Resultate von 43 Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt; die Mittelwerte haben wir in einer Kurvenschar veranschaulicht (Abb. 1 bis 3).

Tabelle I.

Nr.	Injektion von	Blutzucker vorher	Unbestrahlt nach							
			15 Min.	20 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.	100 Min.	120 Min.	180 Min.
1	1 ccm Leinölsäure	0,114	—	0,104	0,110	0,109	—	0,098	—	0,100
2	1 " "	0,090	—	0,108	0,101	0,108	—	0,124	—	0,118
3	1 " "	0,117	—	0,124	0,122	0,124	—	—	0,107	0,121
4	1 " "	0,112	—	0,121	0,119	0,121	—	—	0,103	0,117
5	1 " "	0,101	—	0,115	0,113	0,122	—	0,110	—	0,113
7	1 " "	0,082	—	0,096	0,103	0,091	—	0,084	—	0,089
9	2 " "	0,079	—	0,097	0,098	0,095	—	—	0,160	—
11	2 " "	0,086	—	0,084	0,089	0,132	—	—	0,124	—
	Mittelwerte	0,098	—	0,106	0,107	0,113	—	0,104	0,124	0,110
12	1 ccm Oleinsäure	0,085	—	0,091	0,091	0,089	0,101	—	0,096	—
13	1 " "	0,082	—	0,087	0,085	0,091	0,096	—	0,091	—
14	1 " "	0,087	—	0,085	0,084	0,085	0,098	—	0,098	—
16	1 " "	0,087	—	0,085	0,085	0,092	0,098	—	0,101	—
18	1 " "	0,084	—	0,087	0,080	0,084	0,096	—	0,094	—
20	1 " "	0,084	—	0,087	0,084	0,094	0,084	—	0,096	—
22	2 " "	0,042	—	0,038	0,040	0,026	0,047	—	0,045	—
23	2 " "	0,100	—	0,156	0,160	0,174	0,158	—	0,156	—
	Mittelwerte	0,081	—	0,090	0,089	0,092	0,098	—	0,097	—
24	1 ccm Ricinolsäure	0,113	—	0,141	0,138	0,124	—	0,127	—	0,132
25	1 " "	0,090	0,097	—	0,098	0,104	—	0,100	—	0,098
26	1 " "	0,114	—	0,134	0,150	0,114	—	0,120	—	0,134
27	1 " "	0,099	—	0,078	0,097	0,103	—	0,106	—	0,105
28	1 " "	0,107	—	0,113	0,129	0,147	—	0,133	—	0,111
29	1 " "	0,109	—	0,110	0,116	0,114	—	0,116	—	0,114
	Mittelwerte	0,105	—	0,115	0,121	0,118	—	0,117	—	0,116

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Injektion von	Blutzucker vorher	Bestrahlt nach							
			15 Min.	20 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.	100 Min.	120 Min.	180 Min.
1	1 ccm Leinölsäure	0,118	—	0,118	0,123	0,112	—	0,107	—	0,100
2	1 „ „	0,070	—	0,091	0,089	0,088	—	0,089	—	0,091
3	1 „ „	0,116	0,132	—	0,132	0,123	—	0,118	—	0,132
4	1 „ „	0,099	0,123	—	0,116	0,114	—	0,111	—	0,114
6	1 „ „	0,115	—	0,138	0,134	0,127	—	0,136	—	0,138
8	1 „ „	0,108	—	0,164	0,188	0,189	—	—	—	—
10	2 „ „	0,104	—	0,104	0,106	0,108	—	0,104	—	0,108
	Mittelwerte	0,104	—	0,128	0,127	0,126	—	0,111	—	0,114
12	1 ccm Oleinsäure	0,133	—	0,135	0,119	0,119	0,133	—	0,137	—
13	1 „ „	0,110	—	0,093	0,093	0,094	0,107	—	0,105	—
15	1 „ „	0,080	—	0,108	0,105	0,103	0,108	—	0,110	—
17	1 „ „	0,077	—	0,095	0,100	0,098	0,102	—	0,112	—
19	1 „ „	0,080	—	0,078	0,087	0,089	0,105	—	0,110	—
21	1 „ „	0,078	—	0,094	0,099	0,116	0,141	—	0,193	—
	Mittelwerte	0,093	—	0,101	0,101	0,103	0,116	—	0,128	—
24	1 ccm Ricinolsäure	0,094	0,113	—	0,122	0,122	—	0,117	—	0,117
25	1 „ „	0,087	0,113	—	0,105	0,105	—	0,110	—	0,106
26	1 „ „	0,110	—	0,120	0,124	0,112	—	0,117	—	0,122
27	1 „ „	0,096	—	0,081	0,090	0,083	—	0,094	—	0,106
28	1 „ „	0,115	—	0,126	0,126	0,122	—	0,122	—	0,124
30	2 „ „	0,078	—	0,087	0,083	0,092	0,087	—	0,096	—
	Mittelwerte	0,097	—	0,104	0,108	0,104	—	0,112	—	0,115

Ergebnisse.

1. Leinöl-, Olein- und Ricinolsäure führen, in Dosen von 1 bis 2 ccm subkutan injiziert, beim Kaninchen fast ausnahmslos zu einer geringen aber eindeutigen Hyperglykämie. Damit bestätigt sich unsere früher ausgesprochene Vermutung, daß ungesättigte Fettsäuren an der hyperglykämischen Wirkung pflanzlicher Öle beteiligt sein könnten.

2. Eine gesetzmäßige Überlegenheit der bestrahlten über die unbestrahlten Fettsäuren konnte hinsichtlich ihrer Blutzuckerwirkung nicht festgestellt werden.

Die Gerinnungstendenz des Blutes bei verschiedenen Erkrankungen im Kindesalter.

Von

Josef Csapó.

(Aus der mit dem Stefanie-Kinderspital in Verbindung stehenden Universitäts-Kinderklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 8. Oktober 1926.)

Man hat während der letzten 20 Jahre verschiedene Methoden zur Messung der Gerinnungstendenz des Blutes ausgearbeitet. Der größte Teil dieser Methoden mißt die Gerinnbarkeit des Blutes mit jener Zeit, welche von der Blutentnahme bis zum Beginn der Gerinnung verstreicht. Den Anfang der Gerinnung zu bezeichnen, ist aber ziemlich schwer.

Fonio[1]) wurde wahrscheinlich durch diesen Umstand zur Ausarbeitung einer Methode bewogen, welche teilweise unabhängig von der Zeit, die Gerinnbarkeit des Blutes mit der $MgSO_4$-Konzentration mißt, welche nötig ist, um die Gerinnung auf 2 Stunden zu verhindern. Auch *Gelera*[2]) arbeitete mit ähnlicher Methode. Er nahm als Maß der Gerinnbarkeit des Blutes jene Natriumcitratkonzentration, welche die Gerinnung in der feuchten Kammer eine Stunde lang völlig verhindert. Es scheint öfters notwendig zu sein, in Rahmen der Vorträge die Gerinnbarkeit des Blutes zu demonstrieren, nicht nur bei Hämophilie, wo das Blut auch stundenlang flüssig bleibt, sondern auch bei Morb. mac. Verlhofii, wo die Gerinnung in 30 bis 40 Minuten auch in den schweren Fällen eintritt. Von den verschiedenen Methoden entspricht dem Zwecke noch vielleicht am besten die Methode *Fonios*, indem er die Gerinnbarkeit des Blutes mit der zur Verhinderung der Gerinnung nötigen Salzkonzentration mißt.

Den Gegenstand vorliegender Untersuchungen bildete die Gerinnbarkeit des Blutes bei verschiedenen Krankheiten des Kindesalters. Bevor ich aber mit den systematischen Untersuchungen begonnen hatte, schien es notwendig, eine Methode auszuarbeiten, welche möglichst einfach, verläßlich und auch zur Demonstration geeignet wäre. Das Prinzip der unten beschriebenen Methode ist mit dem *Fonio*schen Koagulovimeter identisch. Ich nahm als Hypothese an, daß

---

[1]) *Fonio*, siehe *Domarus*, Blutuntersuchung 1922.

[2]) *Gelera*, zitiert nach dem Zentralblatt für Kinderheilkunde **11**, 78, 1921.

die Gerinnbarkeit des Blutes mit der zur Verhinderung der Gerinnung nötigen Salzkonzentration direkt proportional ist. Zu diesem Zwecke wählte ich jedoch nicht das $MgSO_4$ und Na-Citrat, sondern das KJ. Unlängst habe ich mit *Klobusitzky*[1]) darauf hingewiesen, daß die Jodide und Rhodanide die Gerinnung des Blutes schon bei einer ganz niedrigen Konzentration verhindern, im Gegensatz zu den Chloriden, welche dieselbe Wirkung erst in viel höherer Konzentration hervorrufen. Das $MgSO_4$ gehört nicht zu den streng neutralen Salzen, die Reaktion ist ein wenig sauer, außerdem enthält es noch Kristallwasser, so daß es erst nach vorheriger Austrocknung genau zu dosieren ist. Das Na-Citrat gehört ebenfalls nicht zu den neutralen Salzen, man bekommt erst dann genaue Werte mit den in verschiedener Zeit beschaffenen Citraten, wenn man sie auf Neutralität vorher prüft bzw. auf den Neutralpunkt bringt. Zur Verhinderung der Blutgerinnung ist es zweckmäßig, ein neutrales Salz zu wählen, weil man nur in diesem Falle mit reiner Salzwirkung zu tun hat, verhindert man die Gerinnung durch ein saures oder alkalisches Salz, so muß immer neben der Salzwirkung auch die Acidität und Alkalinität in Betracht gezogen werden.

Methodik.

Man bereitet sechs KJ-Lösungen von verschiedener Konzentration, und zwar Lösung I ist 0,133 n, Lösung II 0,146 n, Lösung III 0,16 n, Lösung IV 0,173 n, Lösung V 0,186 n, Lösung VI 0,2 n. Man kann sich diese Lösungen von einer 0,2 n Stammlösung in der Weise herstellen, daß man zur Lösung I 13,3 ccm vom 0,2 n KJ und 6,7 ccm destillierten Wassers, zur Lösung II 14,6 ccm 0,2 n KJ und 5,4 ccm destillierten Wassers nimmt, usw. Die Lösungen werden in brauner Flasche mit eingeschliffenem Stöpsel aufbewahrt. Es werden nun in ein Gestell sechs Vidalröhrchen mit abgerundeten Enden gesetzt, und man mißt in das erste Röhrchen 0,45 ccm von Lösung I, in das zweite Röhrchen 0,45 ccm von Lösung II usw. Die so bereiteten Röhrchen werden zum Krankenbett mitgenommen, um das Blut sofort nach der Entnahme mit dem KJ zu vermischen. Die Blutentnahme geschieht in ein paraffiniertes Gefäß mit einer dicken, kurzen, in flüssigem Paraffin ausgekochten Nadel, womöglich ohne Stauung. Unmittelbar nach der Blutentnahme wird zu jedem Vidalröhrchen mit einer 1-ccm-Pipette 0,15 ccm Blut zugegeben und mit dem KJ sofort gut vermischt. Nun bleiben die Röhrchen 16 bis 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach Vermengen der 0,45 ccm KJ-Lösung und der 0,15 ccm Blutes ist die Konzentration des KJ in dem ersten Röhrchen 0,1 n, in dem zweiten 0,11 n, im dritten 0,12 n, im vierten 0,13 n, im fünften 0,14 n, im sechsten 0,15 n. Nach 16 bis 20 Stunden wird das Ergebnis abgelesen. Als Maß der Blutgerinnungstendenz wird jene KJ-Konzentration genommen, welche die Gerinnung des Blutes vollkommen verhinderte. Der völlig oder nur teilweise retrahierte Blutkuchen ist in den Gerinnsel enthaltenden Röhrchen gut wahrzunehmen. In den kein Gerinnsel enthaltenden Röhrchen sind die roten Blutkörperchen zu Boden gesunken und das obenstehende

[1]) *Csapó* und *Klobusitzky*, diese Zeitschr. **157**, 354, 1926.

Plasma flüssig geblieben. Wenn notwendig, z. B. beim Morb. mac. Verlhofii, ist es zweckmäßig, mit niedriger Salzkonzentration zu arbeiten. Die Reihe wird mit 0,08 n KJ angefangen und mit 0,13 n beendet.

Die Untersuchungen wurden bei Kindern von 4 bis 14 Jahren in 62 Fällen angestellt.

Bezüglich der Methodik kann ich folgendes mitteilen. Es ist wichtig, die KJ-Lösung in gut verschließbarer, brauner Flasche aufzubewahren, sonst wird die Lösung fortwährend konzentrierter und die Verhinderungsgrenze stets niedriger. Nach einem längeren Stehen der KJ-Lösung ist es zweckmäßig, mit dem Blute des Kranken parallel das Blut einer gesunden Person der Untersuchung zu unterziehen und die Resultate miteinander zu vergleichen. Das Ablesen ist ziemlich genau, die Grenze scharf und man kommt nur selten in die Lage, daß die Grenze mit einer Genauigkeit von 0,01 n nicht bezeichnet werden kann. Das Ablesen ist nicht an eine genau definierte Zeit gebunden, und deshalb können wir die Methode auch zu Demonstrationszwecken verwenden.

Nach den Ergebnissen ist zur Gerinnungsverhinderung des venösen Blutes in verschiedenem Alter und bei verschiedenen Krankheiten (Tuberkulose, Lues, Osteomyelitis, Pneumonie, Chorea minor usw.) 0,12 bis 0,15 n KJ notwendig, ausgenommen die Hämophilie und einige Fälle von Morb. mac. Verlhofii. Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Gerinnung des venösen Blutes langsamer eintritt als die des arteriellen Blutes. Vor 2 Jahren fand ich mit *Klobusitzky* bei an Hunden ausgeführten Untersuchungen, daß zur Verhinderung der Gerinnung des arteriellen Hundebluts 0,2 n KJ notwendig ist, d. h. entschieden mehr, als sich bei Untersuchungen des venösen Blutes der Kinder ergab. Die bei Tierversuchen gewonnenen Resultate sind zwar nicht ohne weiteres auf die Kinder zu übertragen, wir können doch mit der höchsten Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die 0,08 n Differenz nicht ausschließlich der Rasse zuzuschreiben ist, sondern auch der arterielle bzw. venöse Zustand des Blutes eine Rolle spielt. Wir wissen, daß zwischen der Gerinnung des arteriellen und venösen Blutes eine gewisse zeitliche Differenz besteht, nach diesen Überlegungen ist auch in der zur Gerinnungsverhinderung nötigen Salzkonzentration eine mäßige Differenz zu finden, daraus folgt, daß zwischen der Gerinnungstendenz des Blutes und der zur Verhinderung nötigen Salzkonzentration ein gewisser Zusammenhang besteht. Je größer die Gerinnbarkeit, desto mehr Salz ist nötig, um die Gerinnung zu verhindern. Es ist noch zu bemerken, daß die Technik der Blutentnahme (Venösität) auch bei dieser Methode eine große Rolle spielt. Man soll also eine Stauung, wenn möglich, vermeiden, denn sonst kommt man zu falschen Resultaten.

Es stellte sich auch bei anderen Untersuchungen heraus, daß die Gerinnungstendenz bei verschiedenen Krankheiten, einige Fälle von Morb. mac. Verlhofii ausgenommen, ziemlich konstant ist. Die Schwankung beträgt etwa 25 Proz. Das Blut hämophiler Individuen gerinnt spontan erst nach Verlauf von Stunden oder gerinnt überhaupt nicht. Spontane Gerinnung ist in dem von mir untersuchten Falle nach 8 Stunden eingetreten das 0,07 n KJ enthaltende Blut blieb jedoch auch nach 24 Stunden flüssig. Bezüglich des Morb. mac. Verlhofii teilen sich die Autoren in zwei Gruppen. Einige fanden normale Ge-

rinnungszeit, andere eine verlangsamte. In dieser Hinsicht haben auch meine Untersuchungen kein einheitliches Resultat ergeben. Von den fünf untersuchten Fällen war in dreien eine niedrigere Salzkonzentration als bei anderen Krankheiten zur Verhinderung der Gerinnung nötig, in zwei Fällen ergaben sich normale Resultate.

Bezüglich der Theorie der Blutgerinnung stehen sich zwei Auffassungen gegenüber: die eine ist die Fermenttheorie, die andere die kolloidchemische. Nach der Fermenttheorie geht das gelöste Fibrinogen auf Einwirkung des Thrombins vom Sol- in den Gel-Zustand über. Die kolloidchemische Theorie ist bestrebt, auch die Fermentwirkung mit unseren kolloidchemischen Kenntnissen zu erklären. Vorliegende Untersuchungen geben auch in dieser Hinsicht einige Anhaltspunkte. Rein kolloidchemisch betrachtet, ist zu erwarten, daß die Gerinnbarkeit des Blutes bei der Tuberkulose und bei den pyogenen Erkrankungen infolge der Fibrinogenvermehrung sich erhöht, besonders dann, wenn neben dem normalen Fibrinogen auch ein mehr instabiles Fibrinogen von gröberer Dispersität anwesend ist. Bei erhöhter Gerinnbarkeit braucht man zur Gerinnungsverhinderung auch eine höhere Salzkonzentration. Es stellte sich aber heraus, daß die Grenze der Salzkonzentration bei der Tuberkulose und bei den pyogenen Erkrankungen keineswegs höher liegt als bei irgend einer anderen Krankheit. Dies scheint gegen die rein kolloidchemische Theorie zu sprechen, die Fermente sind also vorläufig nicht ganz zu vernachlässigen.

Aus den mit *Klobusitzky*[1]) an Hunden ausgeführten Untersuchungen hat es sich ergeben, daß die Wirkung der einzelnen Neutralsalze deutlich verschieden ist. Wir brauchen zur Gerinnungsverhinderung von den Chloriden viel mehr als z. B. von den Jodiden. Im folgenden habe ich zur Verhinderung der Gerinnung des venösen Blutes statt KJ NaCl angewendet. Die Methodik ist mit der oben für KJ beschriebenen identisch, nur die Salzkonzentration mußte gehoben werden, um die Gerinnung in den letzten zwei bis drei Röhrchen auf 16 bis 20 Stunden zu verhindern. Auch hier wurden sechs NaCl-Lösungen von verschiedener Konzentration bereitet und in jedes Vidalröhrchen 0,45 ccm NaCl und 0,15 ccm Blut abpipettiert. Die NaCl-Konzentration war nach Vermischen mit dem Blute in dem ersten Röhrchen 0,16 n, im zweiten 0,18 n, im dritten 0,2 n usw., in dem letzten 0,26 n.

Mit NaCl wurden insgesamt bei zehn Kindern Untersuchungen angestellt. Das NaCl verhinderte die Blutgerinnung erst in 0,18 bis 0,22 n Lösung im Gegensatz zu dem 0,12 bis 0,15 n KJ. Die gerinnungsverhindernde Wirkung des NaCl ist also nicht nur bei dem arteriellen, sondern auch bei dem venösen Blute geringer als die des KJ.

---

[1]) *Csapó* und *Klobusitzky*, diese Zeitschr. **157**, **354**, **1925**.

Zusammenfassung.

Ich habe mit einer von mir ausgearbeiteten Methode die Gerinnbarkeit des venösen Blutes bei verschiedenen Krankheiten des Kindesalters bestimmt. Als Maß der Gerinnungsfähigkeit wurde jene KJ- bzw. NaCl-Konzentration genommen, welche die Gerinnung des Blutes auf 16 bis 20 Stunden verhinderte. Nach den Untersuchungsergebnissen zeigt sich in der Gerinnbarkeit des venösen Blutes bei den verschiedenen Krankheiten keine große Differenz. Die Schwankung beträgt etwa 25 Proz. Es bilden nur die Hämophilie und einige Fälle von Morb. mac. Verlhofii eine Ausnahme, in welchen die Gerinnbarkeit erniedrigt ist. Zur Verhinderung der Gerinnung des venösen Blutes ist eine geringere Salzkonzentration notwendig als zu der des arteriellen Blutes. Die Fibrinogenvermehrung steigert die Gerinnbarkeit nicht. Die gerinnungsverhindernde Wirkung der verschiedenen Salze ist nicht gleich: die des KJ ist größer, die des NaCl geringer.

Verwendung von flüssigem Paraffin bei biologisch- und kolloid-chemischen Untersuchungen.

Von

Hans Bohn.

(Aus der kolloid-chemischen Abteilung des chemischen Laboratoriums der Universität Jena.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Vor einigen Jahren hat *K. Beckmann*[1]) erwähnt, daß Blut, unter Paraffinöl aufgefangen und aufbewahrt, seine ursprüngliche Kohlensäurespannung viele Stunden lang beibehält, und kürzlich hat *A. Gutbier*[2]) ein Verfahren beschrieben, das die Dialyse leicht zersetzlicher, besonders leicht oxydabler, kolloid-disperser Systeme unter flüssigem Paraffin ohne Störung durchzuführen gestattet.

In der Tat erscheint flüssiges Paraffin schon auf den ersten Blick als Schutzmittel bei biologisch- und kolloid-chemischen Arbeiten als ganz besonders geeignet. Es schwimmt auf Wasser und wässerigen Lösungen, breitet sich nicht wie andere Öle mit „aktiven Gruppen"[3]) auf Wasser aus, sondern bedeckt eine begrenzte Wasseroberfläche erst, wenn eine größere Menge von Paraffintropfen zusammengeflossen sind, und ist in Wasser von gewöhnlicher Temperatur sehr wenig, bei steigender Temperatur nur in geringem Grade zunehmend löslich[4]). Es löst ferner von Alkohol nur kleine Mengen, von Phenol 1 Proz. bei 15°[5]), mischt sich dagegen mit Äthyläther in jedem Verhältnis, so daß man in Äther ein vortreffliches Mittel besitzt, um Glasgefäße usw. von flüssigem Paraffin vollständig befreien zu können. In Seifen vermag es sich zu leichten Verbindungen aufzulösen, die bisweilen gleiche Teile von Seife und von Paraffinöl enthalten[6]). Kohlensäure und Wasserstoff werden von flüssigem Paraffin in

---

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **29**, 579, 1922.

[2]) Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **146**, 411, 1925.

[3]) *Irving Langmuir*, Journ. Amer. Chem. Soc. **39**, 1848, 1906.

[4]) *E. Groschuff*, Zeitschr. f. Elektrochem. **17**, 348, 1911.

[5]) *Jules Cofmann-Nicoresti*, Pharmaz. Journ. **108**, 349.

[6]) *Spencer Umfreville Pickering*, Journ. Chem. Soc. London **111**, 86

so geringer Menge aufgenommen, daß diese Gasabsorption praktisch durchaus vernachlässigt werden kann; der Absorptionskoeffizient für Sauerstoff ist von *Franz Fischer* und *G. Pfleiderer*[1]) bei 0° und 760 mm Druck zu 0,114 bestimmt worden. Sonst ist noch daran zu erinnern, daß die Fortpflanzung der Elektrizität in flüssigem Paraffin nach *S. Souré de Villemontée*[2]) geradeso sich verhält wie die Elektrizitätsleitung in kristallisierten Körpern, und daß die Dielektrizitätskonstante nach *W. M. Thorton*[3]) 2,55, nach *Hasenöhr*[4]) 2,1179 beträgt. Zur Reinigung und Prüfung des Präparates haben *E. Muschler*[5]), *E. Utz*[6]) und *H. Mix*[7]) geeignete und brauchbare Methoden mitgeteilt.

Angeregt durch die in der kolloid-chemischen Abteilung des Jenaer Laboratoriums mit besten Erfolgen benutzte Arbeitsweise *A. Gutbiers*[8]). habe ich ein Verfahren ausgearbeitet, um flüchtige Gase enthaltende Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin, Liquor cerebrosp. und andere, sowie andere bei Luftzutritt leicht oxydable Systeme unter Luftausschluß aufzufangen, aufzubewahren, auf ihre Wasserstoffionenkonzentration und Leitfähigkeit hin zu untersuchen, oder sie zur Gasanalyse in geeignete Apparate überzuführen.

Die Methodik ergab sich im Laufe von eingehenden Studien über die Bedeutung der Kohlensäure im Urin, über die demnächst berichtet werden wird, und deren heute noch wenig bekannter Einfluß auf die Wasserstoffzahl des Urins bereits von *E. K. Marshall jun.*[9]) und von *J. L. Gamble*[10]) gewürdigt worden war. Die von diesen beiden Forschern gewählte Art der Sammlung von Urin in geeignet großen Präparatengläsern, die, völlig gefüllt, sogleich mit Glasstöpseln verschlossen wurden, erwies sich bei meinen eigenen Untersuchungen als nicht zweckmäßig und dann, wenn es nötig war, zeitlich auseinanderliegende Vergleichsversuche auszuführen, für die Konstanterhaltung der Kohlensäure als durchaus ungenügend.

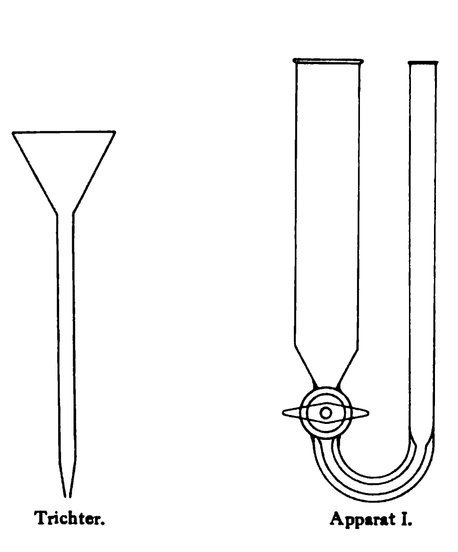
Einfache Glasapparate, wie sie durch die folgenden Bilder ohne weiteres verständlich gemacht sind, sorgfältig geeichte Mikropipetten und reines, flüssiges Paraffin gestatten ein sicheres Arbeiten und die Vermeidung aller Störungen. Der Urin wird in das Gefäß I durch den in eine am Boden befindliche Paraffinschicht tauchenden und dann wieder herausnehmbaren Trichter gelassen. Man saugt

---

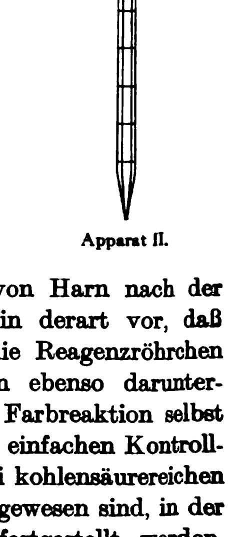
[1]) Ges. Abh. z. Kenntn. d. Kohle **5**, 567, 1920.
[2]) C. r. de l'Acad. d. scienc. **141**, 179, 1905; **158**, 1414, 1914.
[3]) Proz. Royal Soc. London **82**, 422.
[4]) *Landolt-Börnstein*, Ppys.-chem. Tabellen 1923.
[5]) Münchener med. Wochenschr. **64**, H. 9/10, S. 1350.
[6]) Pharmazeut. Zentralhalle **60**, 257.
[7]) Kolloid-Zeitschr. **17**, H. 1, S. 7, 1915.
[8]) Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **146**, 411, 1925.
[9]) Journ. of biol. Chem. **51**, 3, 1922.
[10]) Ebendaselbst **51**, 295, 1922.

weiter den eingeflossenen Urin aus dem schmäleren, durch ein Kapillarrohr mit dem breiteren verbundenen Schenkel, in den die Meßpipette bereits eingesetzt ist, bei geöffnetem Glashahn an und führt ihn zur weiteren Untersuchung in die betreffenden Apparate über. Die wenigen in der Kapillare befindlichen Urintropfen lassen sich bei schräg gestelltem Gefäß herauspipettieren. So können ein und derselben Harnmenge immer geeignete Teile entnommen werden, ohne daß die Gefahr eines Verlustes an Kohlensäure besteht.

In der gleichen Weise wird der Apparat II mit Hilfe des Trichters bedient. Ein Dreiweghahn gestattet bei geeigneter Stellung, die Pipette mit Harn zu füllen, bei anderer Stellung den Harn unmittelbar in andere Gefäße abfließen zu lassen.



Trichter. Apparat I.



Apparat II.

Man nimmt *Messungen der Wasserstoffzahl* von Harn nach der Indikatormethode von *L. Michaelis* unter Paraffin derart vor, daß man je 2 ccm Urin unter flüssiges Paraffin in die Reagenzröhrchen eintreten läßt und später die Indikatorlösungen ebenso darunterschichtet. Geht man so vor, so ändert sich die Farbreaktion selbst sehr kohlensäurereicher Harne nicht. Durch einen einfachen Kontrollversuch kann man sich davon überzeugen, daß bei kohlensäurereichen Urinen, die einige Zeit mit der Luft in Berührung gewesen sind, in der Wasserstoffzahl Unterschiede und Änderungen festgestellt werden, die die zulässige Fehlergrenze oft um weit mehr als das Doppelte übersteigen.

Wie ich an anderem Orte beweisen werde, ist die *Gaskettenmessung* unter Anwendung der von *L. Michaelis* für Blut angegebenen U-Elektrode den Indikatormethoden unbedingt vorzuziehen; sie sollte mehr als bisher auch bei klinischen Untersuchungen benutzt werden. Ich pflege derartige Messungen wie folgt durchzuführen.

Das Verbindungsstück der beiden U-Schenkel wird mit flüssigem Paraffin angefüllt, unter das man die Spitze der Pipette des Apparats II einführt und den Urin treten läßt. Durch leichtes Schwenken des Elektrodengefäßes wird der Harn an die Platinelektrode gebracht, indem man gleichzeitig bewirkt (das läßt sich ohne jede Schwierigkeit durchführen), daß das Paraffin in den offenen Schenkel läuft. Alsdann wird eine genügend große Blase von Wasserstoff eingeleitet und so viel Urin aus der Pipette in das Elektrodengefäß nachgefüllt, daß das Paraffin bis auf eine dünne Schicht herausfließt. Man schließt das Gefäß und schüttelt in bekannter Weise. Leicht läßt sich bei einiger Übung vermeiden, daß nach Beendigung des Schüttelns Paraffin an der Elektrodenseite klebt; doch stören, vorausgesetzt natürlich, daß der Platindraht überhaupt noch in die Untersuchungsflüssigkeit eintaucht, einige Tropfen oder selbst eine dünne, rings um den Draht befindliche Schicht von Paraffin genaue Messungen nicht.

Gewöhnliche Urine, einmal ohne, dann unter Paraffin in der U-Elektrode untersucht, ergaben gegen die Nullelektrode gleiches Potential (Tabelle I). Das Potential stellt sich bei der Anwendung von Paraffin in der gleichen Zeit wie die Kontrollelektrode auf konstanten Wert ein und bleibt 24 Stunden unverändert. Es erscheint mir wichtig, im Zusammenhang hiermit darauf hinweisen zu können, daß Lösungen von verdünnter Salz- und Schwefelsäure in der Birnelektrode unter dauerndem Durchleiten von Wasserstoff und in der U-Elektrode unter flüssigem Paraffin gemessen, immer identische Potentialwerte (Tabelle II) lieferten.

Wurde Harn aus besonderen Gründen, oder werden andere schäumende Flüssigkeiten in der Birnelektrode untersucht, so kann man durch Zugabe einiger Tropfen flüssigen Paraffins das Schäumen selbst sehr schaumfähiger Flüssigkeiten derart herabsetzen, daß beim Durchleiten von Wasserstoff die Lösung nicht aus dem Elektrodengefäß herausgeschleudert wird.

Hinzugefügt mag schließlich noch werden, daß es, wenn man immer dasselbe Elektrodengefäß benutzt, genügt, das Gefäß vor neuen Messungen erst mit Wasser und dann einmal mit der zu untersuchenden Flüssigkeit auszuschwenken.

Um *Leitfähigkeitsmessungen unter flüssigem Paraffin* auszuführen, wird unter eine den Boden des Gefäßes eben ausfüllende, etwa 1 bis 2 mm hohe Schicht von Paraffin so viel Harn gebracht, daß er die bei

der Messung der Widerstandskapazität des Gefäßes festgelegte Marke erreicht[1]). Man nimmt diese Marke für das Arbeiten unter Paraffin zweckmäßig ein wenig höher, als dies sonst nötig ist, damit etwa an der Unterseite des Platins sich fangende Paraffintropfen durch leichtes Bewegen des Elektrodenpaares zum Aufsteigen gebracht werden können.

Die Messungen der Widerstandskapazität des Gefäßes mit und ohne Paraffin lieferten unter Verwendung von n/50 Kaliumchloridlösung gleiche, in den Fehlerbereich der Methode fallende Ergebnisse. Ebenso gaben Leitfähigkeitsmessungen von gewöhnlichen, an Kohlensäure nicht reichen Urinen, mit und ohne Paraffin untersucht, gleiche Resultate. Aber auch unter gewissen Vorbedingungen erhaltener sehr kohlensäurereicher Harn zeigte, wenn er unter seiner ursprünglichen Kohlensäurespannung und dann, wenn er nach mehrstündiger Wasserstoffdurchleitung seines flüchtigen Kohlensäureanteils beraubt untersucht wurde, im letzten Falle nur eine etwa 2 Proz. höhere Leitfähigkeit, infolge Vermehrung der stärker dissoziierten Carbonatkomponente, während im Gegensatz dazu die Messungen der Potentialdifferenzen stark geänderte Werte ergaben.

Der Schwerpunkt der Anwendung einer Schutzschicht von flüssigem Paraffin bei Leitfähigkeitsmessungen dürfte sich auf die Untersuchung von Stoffen erstrecken, die bei Luftzutritt durch Oxydation Veränderung erleiden.

Zur Bestimmung der *Gesamtkohlensäure* im *Barcroft*schen Apparat lieferte die Pipette des Apparats II genau die nötige Menge von 1,0 ccm Urin und gestattet die unmittelbare Unterschichtung unter die Ammoniaklösung. Bei diesen Versuchen bleibt der Gesamtkohlensäuregehalt des Harns während 8 Tagen völlig unverändert.

Es enthielt z. B. ein unter gewissen Vorbedingungen erhaltener sehr kohlensäurereicher Harn:

am	2. Juli	1925	31,118	Vol.-Proz.	CO_2
„	10. „	1925	31,23	„	CO_2
„	15. „	1925	32,62	„	CO_2

Harne, in sterilen Zylindern unter Paraffin aufgefangen, zeigten tagelang keine ammoniakalische Gärung; die Ammoniakwerte nahmen erst vom sechsten Tage ab ganz allmählich zu, z. B.:

	Harn	enthielt	am	15. Juli	34,00	mg-Proz.	Ammoniak
Derselbe	„	„	„	16. „	34,00	„	„
„	„	„	„	17. „	34,00	„	„
„	„	„	„	20. „	34,00	„	„
„	„	„	„	23. „	39,10	„	„
„	„	„	„	28. „	57,70	„	„

[1]) *E. Müller*, Elektrochem. Praktik 1924, S. 39.

Wie lange unter völlig aseptischen Vorsichtsmaßregeln aufgefangener Harn unverändert unter Paraffin aufbewahrt werden kann, wenn auch die Entnahme der Untersuchungsproben ganz aseptisch ausgeführt wird, darüber sind Untersuchungen im Gange.

Zusammenfassung.

Es wird ein zweckmäßiges Verfahren angegeben, um Körperflüssigkeiten bzw. andere bei Luftzutritt veränderliche Systeme unter Ausschluß von Luft aufzufangen, aufzubewahren, ihre Untersuchung auf Wasserstoffionenkonzentration und Leitfähigkeit durchzuführen bzw. sie in andere Apparate zwecks weiterer Bestimmung überführen zu können.

Die Ausarbeitung der neuen Verfahren ist, wie auch hier mit aufrichtigem Dank hervorgehoben werden soll, durch eine Herrn Prof. Dr. *A. Gutbier* durch die „Gesellschaft der Freunde der Thüringischen Landesuniversität Jena" übermittelte Spende des Herrn Fabrikbesitzers *Felix Günther* in Greiz ermöglicht worden.

Tabelle I.

Potentialdifferenzen von verschiedenen Urinen gegen die gesättigte Kalomelelektrode. Als Elektroden wurden benutzt: die U-Elektrode nach *L. Michaelis*, ohne und dann unter Paraffin. Temperatur 20°.

Zeit	Ohne Paraffin EMK Millivolt	Mit Paraffin EMK Millivolt	Zeit	Ohne Paraffin EMK Millivolt	Mit Paraffin EMK Millivolt
0'	587,0	589,0	60'	534,5	534,5
10	594,3	595,0	120	534,5	535,0
20	600,0	598,0	24h	—	—
30	600,0	600,5	0'	—	—
60	600,0	600,5	10	—	570,0
120	600,0	600,5	20	575,0	574,0
24h	600,0	600,5	30	576,0	576,0
0'	594,0	591,0	60	576,0	576,5
10	598,0	600,0	120	576,0	576,5
20	599,5	603,5	24h	—	—
30	604,5	605,5	0	563,0	—
60	605,0	605,5	10	571,0	—
120	605,0	605,5	20	577,0	578,0
24h	—	—	30	576,5	577,5
0'	515,0	—	60	576,5	577,5
10	532,0	533,5	120	576,5	577,8
20	534,0	534,5	24h	577,0	578,0
30	534,0	534,5			

Tabelle II.

Potentialdifferenzen von *verdünnten* Salzsäure- und Schwefelsäurelösungen gegen die gesättigte Kalomelelektrode. Unter Paraffin in U-Elektrode, zur Kontrolle in Birnelektrode. Temperatur 20°.

Zeit Min.	U-Elektrode und Paraffin EMK Millivolt	Birnelektrode EMK Millivolt	U-Elektrode und Paraffin EMK Millivolt	Birnelektrode EMK Millivolt
0	308,0	302,0	—	317,0
5	306,5	305,0	—	318,0
15	306,0	306,0	317,0	318,0
30	306,0	306,0	318,0	318,0
60	306,0	306,0	318,0	318,0
120	306,0	306,0	318,0	318,0

Experimentelle Leberschädigung mit technischem Chloranil (t. Chl.) und Chloranilnebenprodukt (Chl. N. Pr.).

III. Mitteilung:

Chemie normaler und toxisch geschädigter Kaninchenlebern.

Von

H. Staub.

(Aus der medizinischen Klinik Basel.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1926).

In einer ersten und zweiten Mitteilung[1]) wurde über chemische Untersuchungen zur Darstellung der toxischen Reinsubstanz aus technischem Chloranil (Höchst) und über Stoffwechseluntersuchungen an lebergeschädigten Kaninchen berichtet. Im folgenden sind die Resultate über chemische Aufarbeitung von 14 Kaninchenlebern mitgeteilt. Es handelt sich dabei um vier normale, vier im Initialstadium der Vergiftung stehende und sechs vollentwickelte, letale Veränderungen aufweisende Lebern. Es wurden bestimmt: Totalfeuchtgewicht, in absoluter Größe und als Prozente des Körpergewichts, Wassergehalt und Trockensubstanz, spezifisches Gewicht, Ätherextrakt, Gesamt-N, Rest-N, Gesamt-α-Amino-N. In zwei Lebern wurden außerdem noch freier α-Amino-N, NH_3 und Harnstoff bestimmt. Tabelle I enthält alle Versuchsresultate.

Methodische Angaben: Das *Totalfeuchtgewicht* wurde sofort nach Sektion, nach Entfernung der Gallenblase und gröberer Bindegewebsreste am Leberhilus, festgestellt.

Die *Trockengewichtsbestimmung* erfolgte nach Trocknen bei 110° bis zur Gewichtskonstanz.

Das *spezifische Gewicht* der Lebern wurde aus der Differenz des Gewichts eines Leberstückchens in Luft und in Wasser unter Berücksichtigung der Wassertemperatur bestimmt.

Der *Ätherextrakt* ist durch Extraktion von Trockensubstanz im Soxhletapparat während 30 bis 36 Stunden gewonnen.

---

[1]) Erste Mitteilung, diese Zeitschr. 178, 167, 1926; zweite Mitteilung, ebendaselbst 179, 125, 1926.

Tabelle I. Zusammenstellung der Resultate aus der Aufarbeitung normaler und vergifteter Lebern.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
											N-Stoffe		
	Versuchs-Nr.	Dauer der Intoxikation	Durch Verblutung getötet oder vor Sektion nicht ausgeblutet	Körpergewicht vor Exitus	Feuchtgewicht der Leber	Feuchtgewicht d. Leber in Proz. des Körpergewichts	Wassergehalt	Trockensubstanz	Spez. Gewicht der frischen Leber	Ätherextrakt in Proz. des Feuchtgewichts	Ges.-N	Rest-N	Ges.-α-Amino-N
				g	g	g	Proz.	Proz.			in Proz. des Feuchtgewichts		
Normale Lebern	K. 10		nicht entblutet	2200	85	3,9	77,108	22,892	1,180	1,6642	2,2677	0,3584	—
	K. 16		verblutet	2100	92	4,4	72,936	27,064	1,0957	1,4728	2,3755	0,2520	0,0738
	K. 17		„	1775	50	2,8	74,430	25,570	1,0738	3,7179	2,7300	0,4340	0,0817
	K. 18		„	2275	62	2,7	72,200	27,800	1,0902	1,8647	2,7989	0,4305	0,0682
Lebern im Initialstadium der Vergiftung	K. 27	10 Stdn.	nicht entblutet	1650	54	3,3	75,900	24,100	1,0682	2,8177	3,0488	0,4900	0,2500
	K. 9	2 Tage	nicht entblutet	2500	98	3,9	72,604	27,396	1,0690	6,2580	3,2886	0,5040	—
	K. 11	2 „	nicht entblutet	2000	100	5,0	76,276	23,724	1,0664	6,7705	3,4078	0,8750	—
	K. 15	30 Stdn. *)	nicht entblutet	1575	85	5,4	76,320	23,680	1,0612	6,1472	3,9508	0,7321	0,2874
Lebern mit vollentwickelten pathologisch-anatom. Veränderungen	K. 8	8 Tage	nicht entblutet	2550	260	10,2	82,036	17,964	1,0358	5,3121	1,8613	—	—
	K. 13	8 „	nicht entblutet	2225	215	9,7	82,998	17,002	1,041	4,8704	1,6423	0,4410	—
	K. 14	6 „	nicht entblutet	2475	203	8,2	86,228	13,772	1,034	1,9996	1,1732	0,4550	—
	K. 26	7 „	nicht entblutet	1950	124	6,4	79,580	20,420	1,0463	5,3080	2,0695	0,4900	0,1969
	K. 33	6 „	verblutet	2950	174	5,9	79,844	20,156	1,0423	4,9334	2,2114	0,2772	0,1055
	K. 34	$6^1/_2$ „	nicht entblutet	2000	160	8,0	82,912	17,088	1,0392	3,6440	2,1530	0,2968	0,1069

*) Zweimalige Giftzufuhr (12 Tage nach erster Giftzufuhr zweite Giftdosis 30 Stunden später Exitus)

Die *Gesamt-N-Bestimmung* geschah in der Trockensubstanz nach *Kjeldahl.*

Die *Rest-N-Fraktion* ist durch Enteiweißen frischer, feingehackter und zerriebener Leber mit heißer n/100 Essigsäure, wiederholtem Aufkochen und Nachfällen mit kolloidaler Eisenlösung gewonnen.

Der Rest-N ist nach *Kjeldahl,* der *Aminosäuren-N* nach *van Slyke, Harnstoff- und* NH_3*-N* mit kombinierter Ureasemethode in der Rest-N-Fraktion bestimmt.

Die N-Stoffe sind auf Prozente des Feuchtgewichts umgerechnet.

Die Tabelle I ist so angeordnet, daß wir bei einem Vergleich der Zahlen von oben nach unten, mehr oder weniger die Veränderung in der Leberzusammensetzung während der verschiedenen Stadien der Vergiftung sich entwickeln sehen.

Aus Stab 5 und 6 geht hervor, daß das *Gewicht der Leber* sowohl absolut als in Prozenten des Körpergewichts ganz erheblich zunimmt. Einer Durchschnittszahl von 3,45 Proz. (in Relation zum Körpergewicht) bei gesunden Lebern steht eine solche von 8,07 Proz. bei vollentwickeltem Vergiftungsbild gegenüber. Die Maximalzahlen sind bei K 8 und 13 mit 260 und 215 g absolutem Gewicht und 10,2 und 9,7 Proz. vom Körpergewicht erreicht. Es sind dies zugleich diejenigen Tiere, bei welchen die Vergiftung am längsten gedauert hat (vgl. Stab 2 der Tabelle).

Stab 7 und 8 zeigen eine erhebliche Zunahme des *Wassergehalts* und Verminderung der *Trockensubstanz* im voll entwickelten Intoxikationsstadium. Der höchste Wassergehalt ist bei K 14 mit 86,228 Proz. erreicht. Vergleichen wir Durchschnittszahlen normaler mit denjenigen extrem geschädigter Lebern, so erhalten wir:

	Wassergehalt Proz.	Trockensubstanz Proz.
Für normale Lebern	74	26
Für die schwer geschädigten Lebern	82	18
Dazwischen liegen die Werte für Lebern mit Initialschädigungen	75	25

Das *spezifische Gewicht* (Stab 9) bietet ein nicht erwartetes, auffallend konstantes Bild. Mit zunehmender Schwere der Leberschädigung nimmt es ab. Es geht ungefähr der Größe des Wassergehalts parallel; z. B. trifft der größte Wassergehalt bei K 14 mit dem niedrigsten spezifischen Gewicht von 1,034 zusammen. Ein Vergleich mit Durchschnittswerten ergibt für:

normale Lebern	1,085
beginnende Leberveränderungen	1,066
schwere Leberschädigungen	1,040

Außer durch den Wassergehalt wird das spezifische Gewicht natürlich wesentlich durch den Fettgehalt beeinflußt. Ein Vergleich der *Ätherextrakt*zahlen in Stab 10 mit dem spezifischen Gewicht zeigt diesen Zusammenhang für normale und wenig geschädigte Lebern einwandfrei. Der Ätherextraktwert steigt im Beginn der Intoxikation an. Wir bekommen die prozentual höchsten Werte in den Fällen, die 2 Tage nach der Vergiftung untersucht wurden (K 9, 11 und 15). In der schwer geschädigten Leber,

6 bis 8 Tage nach der Giftzufuhr, sinkt der prozentuelle Gehalt an ätherlöslichen Substanzen wieder etwas und kann z. B. in Versuch K 14 einen vollkommen normalen Wert darstellen. In absoluten Werten jedoch ist in den erheblich vergrößerten Lebern des voll entwickelten Krankheitsbildes mehr Fett vorhanden als in der normalen oder wenig geschädigten Leber. Der absolute Fettgehalt der Leber in Prozenten des Körpergewichts ausgedrückt, zeigt diese Verhältnisse besonders deutlich (vgl. Tabelle II).

Die Prozentzahlen, bezogen auf das Feuchtgewicht für den *Gesamt-N* (Stab 11), für *Rest-N* (Stab 12) und für Gesamt-α-Amino-N (Stab 13) haben ihre höchsten Werte im Beginn der Intoxikation (K 27, 9, 11 und 15). In der schwer veränderten Leber nach letalem, typischem Intoxikationsverlauf ist der prozentuale Gesamt-N-Wert wesentlich unter der Norm, der prozentuale Rest-N-Gehalt ist normal oder sehr wenig erhöht und die Gesamt-α-Amino-N-Zahl noch wesentlich über den Normalwerten, aber lange nicht so hoch, wie bei Intoxikationsbeginn (K 27 und 15). Die absoluten Zahlen in der nebenstehenden Tabelle II geben noch ein besseres Bild über die quantitative Änderung in der Leberzusammensetzung während des Intoxikationsverlaufs.

In den Versuchen K 33 und 34 ist die Rest-N-Fraktion noch detailliert aufgearbeitet. Die Werte in Prozenten des Feuchtgewichts sind in der folgenden kleinen Tabelle zusammengestellt.

	Rest-N	α-Amino-N		NH_3-N	Ur+-N
		frei	hydrolytisch		
K 33	0,2772	0,0968	0,0087	0,0420	0,0924
K 34	0,2968	0,0996	0,0073	0,0392	0,0770

Die freie α-Amino-N-Fraktion macht den größten Teil des Rest-N aus.

Die absoluten und die Prozentzahlen, bezogen auf das Körpergewicht, von Trockensubstanz, Ätherextrakt, Gesamt-N, Rest-N und Amino-N, sind in der nebenstehenden Tabelle II zusammengestellt.

Der *absolute H_2O-Gehalt* (Stab 4) ist schon in den Lebern, die im Initialstadium der Vergiftung stehen, höher als in den Normallebern, er entspricht etwa der Zunahme des Totalfeuchtgewichts der Leber, ausgedrückt in Prozenten des Körpergewichts (Tabelle I, Stab 6). Ein Vergleich der Summen der Körpergewichte und des Leberwassergehalts aller vier normalen Tiere mit den gleichen Werten der vier Lebern, die im Beginn der Vergiftung standen, ergibt:

	Körpergewicht g	H_2O-Gehalt der Lebern g
Für normale Tiere	8350	214,62
Für Tiere im Beginn der Intoxikation	7725	253,29

Es kann gegen die Beweiskraft dieser Zahlen eingewendet werden, daß durch die verschiedene Todesart, durch Verbluten in den Normalfällen, durch Spontantod ohne Entbluten in den pathologischen Fällen, der Blutgehalt und damit auch die Wassermenge der Leber wesentlich beeinflußt werden. Dagegen ist aber zu sagen, daß sowohl bei den entbluteten, wie bei den spontan ad exitum gekommenen Tieren, die Lebern bei der Sektion

Tabelle II. Absolute Werte der verschiedenen Leberbestandteile und prozentuale Zahlen, bezogen auf Körpergewicht.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
				Trockensubstanz		Ätherextrakt		Gesamt-N		Rest-N		Gesamt-α-Amino-N	
Versuchs-Nr.	Dauer der Vergiftung	Körpergewicht g	Wassergehalt absolut	absolut g	in Proz. des Körpergewichts	absolut g	in Proz. des Körpergewichts	absolut g	in Proz. des Körpergewichts	absolut g	in Proz. des Kö.pergewichts	absolut g	in Proz. des Körpergewichts
K. 10	Normallebern	2200	65,54	19,46	0,884	1,41	0,064	1,93	0,087	0,30	0,013	—	—
K. 16	Normallebern	2100	67,10	24,90	1,186	1,35	0,064	2,18	0,108	0,23	0,011	0,067	0,003
K. 17	Normallebern	1775	37,22	12,78	0,720	1,86	0,104	1,36	0,076	0,22	0,012	0,041	0,002
K. 18	Normallebern	2275	44,76	17,24	0,758	1,16	0,051	1,73	0,076	0,27	0,011	0,042	0,001
K. 27	10 Stdn.	1650	40,99	13,01	0,789	1,52	0,092	1,65	0,100	0,26	0,015	0,135	0,008
K. 9	2 Tage	2500	71,15	26,85	1,074	6,13	0,245	3,23	0,130	0,49	0,019	—	—
K. 11	2 „	2000	76,28	23,72	1,186	6,77	0,338	3,41	0,170	0,87	0,043	—	—
K. 15	30 Stdn. *)	1575	64,87	20,13	1,278	5,22	0,331	3,36	0,213	0,62	0,034	0,244	0,015
K. 8	8 Tage	2550	213,29	46,71	1,832	13,81	0,541	4,84	0,190	—	—	—	—
K. 13	8 „	2225	178,45	36,55	1,643	10,47	0,470	3,53	0,159	0,95	0,042	—	—
K. 14	6 „	2475	175,04	27,96	1,130	4,06	0,164	2,38	0,096	0,92	0,037	—	—
K. 26	7 „	1950	98,68	25,32	1,300	6,58	0,337	2,57	0,132	0,61	0,031	0,227	0,012
K. 33	6 „	2950	138,93	35,07	1,189	8,56	0,290	3,85	0,130	0,48	0,006	0,183	0,006
K. 34	6$^1/_2$ „	2000	132,66	27,34	1,367	5,83	0,291	3,44	0,172	0,47	0,023	0,171	0,008

*) Zweimalige Vergiftung vgl. Bemerkung auf Tabelle I.

stets durch die Vena portae und Vena cava inferior durch gelindes Auspressen möglichst blutarm gemacht wurden. Daß die verschiedene Todesart bei diesem Vorgehen keine wesentlichen Differenzen im Wassergehalt der Leber bedingt, geht aus dem Vergleich der Werte von K 10 und 16 hervor, von denen das eine Tier nicht aus Carotis entblutet, das andere entblutet wurde. Bei ungefähr gleichem Körper- und Lebergewicht ist der absolute Wassergehalt mit 65,54 und 67,1 g nicht wesentlich verschieden.

In den schwer geschädigten Lebern erreicht der absolute H_2O-Gehalt mit 100 bis 200 g eine ganz bedeutende Höhe. Es besteht nach diesen Zahlen kein Zweifel, *daß die absolute Gewichtszunahme der Leber hauptsächlich von der Wasseraufnahme herrührt.*

Die *Trockensubstanz* nimmt absolut und meist auch in Prozenten des Körpergewichts mit der Dauer der Vergiftung zu. K 16 fällt aus der Reihe. Ein gleiches Anwachsen zeigen auch die absoluten Werte von *Ätherextrakt*, während die Prozentzahlen des Ätherextrakts vom zweiten Tage der Vergiftung an bis zum Exitus nicht mehr eindeutig ändern. Nur in den Versuchen K 8 und 13 mit größten Gewichtszunahmen der Leber erreichen auch die Prozentzahlen des Ätherextrakts höhere Werte.

Die absoluten und prozentualen Werte des *Gesamt-N*, *Rest-N und a-Aminosäuren-N* erreichen am zweiten Tage nach der Giftzufuhr bereits ein Maximum und bleiben während der weiteren Dauer der Vergiftung auf etwa gleichen absoluten Werten oder sinken auf niedrigere Zahlen ab.

Einen Aufschluß über die Faktoren, welche sich in der Hauptsache an der Zunahme der Trockensubstanz beteiligen, erhalten wir durch den Vergleich der Werte von gesunden und kranken Tieren mit ungefähr gleichem Körpergewicht. Das Eiweißgewicht wird durch Multiplikation der Differenz von Gesamt-N und Rest-N mit der Eiweißzahl 6,25 errechnet.

1. Beispiel:

	Körpergewicht	Ätherextrakt	Eiweißgehalt
K 10 . .	2200	1,41	10,19
K 13 . .	2225	10,47	16,12
Differenz:	—	9,06	5,93

2. Beispiel:

	Körpergewicht	Ätherextrakt	Eiweißgehalt
K 17 . .	1775	1,86	7,12
K 15 . .	1575	5,22	17,12
Differenz:	—	3,36	10,00

Die Trockensubstanzzunahme ist in der Hauptsache auf Zunahme des Ätherextrakts und des Eiweißgehalts zurückzuführen. Die Zunahme des Ätherextrakts ist nur zum geringsten Teile durch Zunahme des Neutralfettes bedingt, denn die Sudan-III-Färbung gibt in den meisten Fällen im mikroskopischen Bilde keinen erhöhten Neutralfettgehalt an.

Die Zunahme des Gesamt-N-Gehalts im Initialstadium der Vergiftung ist nicht zu erklären. Auch wenn die hohen Rest-N-Zahlen subtrahiert werden, bleibt immer noch ein Plus an Gesamt-N gegenüber der normalen

Leber, das durch den in diesem Stadium noch geringgradig vermehrten Serumgehalt nicht völlig gedeckt wird. Teleologisch gedacht, hat es den Anschein, als ob in diesem Stadium der Vergiftung sich N-Substanz anhäuft, die vielleicht für die späteren Reparationsvorgänge von Wichtigkeit ist.

Der hohe Gesamt-N-Gehalt in den schwer veränderten Lebern nach sechs- bis achttägiger Intoxikationsdauer ist durch den reichlichen Serumgehalt gut erklärt. Nehmen wir z. B. in Versuch K 13 einen Serumzuwachs von rund 100 ccm an (Vergleich mit dem etwa gleich-schweren normalen Tiere K 10) und rechnen mit einem Gesamt-N von 1,5 Proz. im Serum, so erhalten wir einen Zuwachs von 1,5 g Gesamt-N statt 1,60 g als Differenz der Gesamt-N-Werte in Versuch K 10 und 13.

Eine Übersicht über die biochemischen Vorgänge in der Leber und ihre Einflüsse auf die Zusammensetzung von Blut und Urin[1]) wird erhalten, wenn wir die Veränderungen in Leber, Blut und Urin nebeneinander erstens im Anfangsstadium der Vergiftung und zweitens im voll entwickelten Vergiftungsbild in Tabellenform darstellen (siehe Tabelle III).

Tabelle III.

Veränderungen in der Zusammensetzung von Leber, Blut und Urin in verschiedenen Vergiftungsstadien.

Leber	Blut	Urin
In den ersten 2 Tagen der Vergiftung:		
Starkes absolutes und prozentuales Ansteigen des *Gesamt-N, Rest-N* und *α-Aminosäuren-N*. Starkes absolutes und prozentuales Ansteigen des *Äther-extraktes*. Geringe Zunahme des *Wassergehalts* und des *Feuchtgewichts der Leber*. Abfall des *spezifischen Gewichts*	Zunahme des prozentualen Harnstoffgehalts	Ansteigen des Harnstoff-, NH_3- und α-Amino-N
	Normale Harnstoffwerte	Normale oder erhöhte Harnstoff-, NH_3- u. α-Amino-N-Zahlen
Im Endstadium der Vergiftung:		
Hochgradige absolute und prozentuale *Gewichts- und Wasserzunahme* der Leber. Starker weiterer Abfall des *spezifischen Gewichts*. Prozentuale Abnahme der *Gesamt-N, Rest-N* und *α-Aminosäuren-N-Werte* gegenüber den ersten Tagen der Vergiftung; absolut bleiben die N-Zahlen ungefähr die gleichen wie im ersten Vergiftungsstadium. Ansteigen des absoluten Gehalts an *Trockensubstanz*. Prozentuale *Ätherextraktwerte* fallen gegenüber dem ersten Vergiftungsstadium ab, die absoluten Werte liegen höher oder unverändert.	Anstieg v. Rest-N, Harnstoff-N und Aminosäuren-N	Abfall des Ur+-N, NH_3-N und α-Amino-N, ev. bis auf unternormale Werte

Nach der Zusammenstellung in Tabelle III setzt rasch nach der Vergiftung ein Eiweißzerfall der Leber ein, der sich organchemisch im Ansteigen des Rest-N und α-Amino-N zeigt. Dieser vermehrte Eiweißzerfall führt zur Vermehrung von Rest-N-Stoffen im Blute und Urin. Etwa gleichzeitig mit dem Eiweißzerfall beginnt die Anhäufung von ätherlöslichen Substanzen in der Leber. Gleichzeitig steigt der Wasser-

[1]) Vgl. zweite Mitteilung, diese Zeitschr. **179**, 125, 1926.

gehalt der Leber, und das spezifische Gewicht fällt. Das Absinken des spezifischen Gewichts ist in diesem Stadium der Vergiftung durch die Anhäufung der ätherlöslichen Körper bedingt. Gleichzeitig kommt es in der Leber zu einer Stapelung von N-Stoffen, wie aus den absolut und relativ hohen Gesamt-N-Zahlen hervorgeht.

Diesem akuten Initialstadium folgt eine Mittelperiode, während welcher sich die Leberzusammensetzung einzig durch Retention einer relativ enormen Menge Wasser verändert.

Im Endstadium hat die Leber durch Wasseraufnahme eine großartige Volumenzunahme erfahren. Im Vergleich mit den Verhältnissen im Initialstadium ist eine Verdünnung der Lebersubstanzen eingetreten, die am Sinken der prozentualen Trockensubstanz-, Ätherextrakt- und Gesamt-N-Werte und dem Abfallen des spezifischen Gewichts deutlich erkennbar ist. Die absoluten Zahlen dieser Lebersubstanzen können zum Teil gegenüber dem akuten Anfangsstadium noch etwas größer geworden sein.

Vergleich der erhobenen organ-chemischen Befunde mit bekannten Untersuchungsresultaten an normalen und pathologischen Tier- und Menschenlebern.

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Kaninchenlebern sind in der Literatur nicht so häufig, daß es als überflüssig erscheinen möchte, auch die gefundenen Normalzahlen in Vergleich mit den neueren Resultaten an normalen Menschen und Hunden zu setzen. Die Zusammenstellungen sind in Tabellenform aufgeführt:

Tabelle IV.

Normale Lebern.

		Trockensubstanz	Ätherextrakt	Gesamt-N	Rest-N
		in Prozenten des Feuchtgewichts			
Mensch:	*Wells, H. G.*[1] . .	22,4	5,0	—	—
	Hoppe-Seyler[2] . .	24	3,7	2,7	0,36
	Becher, E.[3] . . .	—	—	2,8	0,22
	Feigl, J.[4]	23—26	2,6—3,6	—	—
Hund:	*Wakemann, A. J.*[5]	27,0	—	3,1	—
	Becher, E.[3] . . .	—	—	3,2 u. 3,4	0,24 u. 0,29
Kaninchen:	*Neubauer*[6]	—	3—4	—	—
Eigene Versuche (Grenzwerte)		22,9—27,0	1,4—3,7	2,3—2,8	0,25—0,43

[1]) Journ. of Biol. Chem. **5**, 129, 1908/09.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 67, 1921.
[3]) D. Arch. f. klin. Med. **128**, 1 u. **129**, 1, 1919.
[4]) Diese Zeitschr. **115**, 22. 1921.
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 335 u. 341, 1905.
[6]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **61**, 181, 1909.

Die Werte normaler Kaninchenlebern stimmen mit den Werten von Menschen- und Hundelebern überein.

Tabelle V.

Pathologische Lebern.

	Trocken-substanz	Äther-extrakt	Gesamt-N	Rest-N	Amino-N
	in Prozenten des Feuchtgewichts				
Phosphorlebern:					
Mensch: Grenzwerte aus einer Tab. bei *Loewi*[1])	32,1–43,5	19,5–37,7	—	—	—
Hund: *Wakemann*[2]) . .	22–27	—	1,7–2,0	—	—
Chloroformlebern:					
Mensch: *Wells*[3]) . . .	27,6	8,8	—	—	—
Akute gelbe Leberatrophie:					
Grenzwerte aus einer Tabelle von *Wells*[3]) .	14–23	2–8,7	—	—	—
Stadie und *v. Slyke*[4]) .	28,3	13,5	2,4	0,315	0,206
Feigl[5]) (Grenzwerte) .	16,9–41,7	3,2–26,0	2,06–2,64	0,16–0,43	0,12–0,27
Hoppe-Seyler[6]) (Mittelzahlen)	18,5	—	2,2	0,58	—
Vergiftung mit Chl. N. P. (eigene Versuche):					
a) Im Initialstadium d. Vergiftung (Grenzw.)	23,7–27,4	2,8–6,8	3,0–3,9	0,49–0,87	0,25–0,29
b) Bei voll entwickelter Leberschäd. (Grenzwerte)	13,8–20,4	2,0–5,3	1,2–2,2	0,27–0,49	0,10–0,20

1) *Loewi* in v. Nordens Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels 2, 729, 1907.
2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 335, 1905.
3) Journ. of biol. Chem. 5, 143, 1908/09.
4) Arch. of internal Med. 20, 693, 1920.
5) Diese Zeitschr. 115, 22, 1921.
6) Zeitschr. f. physiol. Chem. 116, 67, 1921.

Die Resultate über Aufarbeitung der Phosphor- und Chloroformleber sind, soweit ich die Literatur übersehe, besonders in bezug auf die N-Fraktionen unvollständig. *Wells*[1]) hat einzig, soviel mir bekannt ist, auch die einzelnen N-Fraktionen bestimmt und die verschiedenen Aminosäuren quantitativ isoliert. (Die Werte für die Rest-N-Fraktionen fehlen in Tabelle V, weil die passenden Vergleichswerte nicht aus den Angaben *Wells* errechnet werden konnten.)

Die Tabelle V illustriert deutlich, daß wir es im voll entwickelten Stadium der Vergiftung mit Chl. N. Pr. mit einer neuartigen Leberschädigung zu tun haben. Am ehesten sind die Prozentwerte denjenigen der akuten gelben Leberatrophie vergleichbar; doch liegt bei der Vergiftung

1) Journ. of biol. Chem. 5, 143, 1908/09.

mit Chl. N. Pr., absolut genommen, keine Atrophie, sondern eine erhebliche Volumenzunahme der Leber vor. Gegenüber der Chloroform- und Phosphorleber unterscheidet sich unsere Leber hauptsächlich durch den geringeren Ätherextraktgehalt. Alle übrigen Details können aus der Tabelle V ersehen werden.

Pathologisch-anatomische Bemerkungen[1]).

Die Sektion der akuten letalen Vergiftungsfälle ergibt eine enorme Vergrößerung der Leber. Die Leber ist hellbraun, von weicher Konsistenz, manchmal ist sie so weich, daß sie auf gelinden Druck zerfließt. Die Läppchenzeichnung ist verschwunden. In einigen Fällen besteht geringgradiger Ascites. An den übrigen Organen ist makroskopisch kein krankhafter Befund zu erheben.

Gehen die Tiere erst einige Wochen nach der Giftzufuhr ein, so ist die Leber geschrumpft, hart, mit zum Teil tieferen Narben. Es besteht das Bild einer atrophischen Lebercirrhose. Die Milz ist vergrößert. Regelmäßig ist reichlicher Ascites vorhanden.

Mikroskopisch finden sich in einer ersten Vergiftungsphase im Zentrum der Leberläppchen Aufhellung des Protoplasmas und Auftreibung und verminderte Färbbarkeit des Kerns der zentralen Leberzellen; an der Peripherie der Läppchen quellen die Zellen. In einer zweiten Vergiftungsphase folgen ausgedehnte blasige Entartung der peripheren Leberzellen und unregelmäßig im Lebergewebe zerstreute Nekrosen. In ausgesprochenen Vergiftungsbildern ist die Entwicklung von „Blasenzellen" so großartig, daß von der Leberstruktur kaum mehr Andeutungen vorhanden sind. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen entsprechen qualitativ Veränderungen, wie sie nach Chloroform, Phenylhydrazin und Granugenol von *Jaffé*[2]) und *B. Fischer*[3]) beschrieben sind. Die Ausbildung der Blasenzellen ist aber nach Vergiftung mit Chl. N. Pr. viel großartiger.

An den übrigen Organen findet sich mikroskopisch bei den in 6 bis 10 Tagen letal verlaufenen Fällen keine nennenswerte Veränderung. Die pathologisch-anatomischen Untersuchungen ergaben, daß das Chl. N. Pr. exquisit die Leber schädigt.

Durch die chemische Aufarbeitung der Leber ist bewiesen, daß es sich bei der „blasigen Entartung" der Leberzellen tatsächlich um ein Leberzellödem handelt, wie es *B. Fischer* annahm. Das Lebergewebe wird, wie gezeigt wurde, wasserreicher.

Zusammenfassung.

Vier normale Lebern, vier Lebern von Anfangsstadien der Chl. N. Pr.-Vergiftung und sechs Lebern mit voll entwickelten typischen, pathologisch-anatomischen Veränderungen wurden auf Trockensubstanz, Ätherextrakt, Gesamt-N, Rest-N, Amino-N und teilweise auch auf

[1]) Die ausführlichen Sektionsprotokolle und pathologisch-anatomischen Untersuchungen werden an anderen Orten mitgeteilt.
[2]) Frankfurter Zeitschr. f. Pathol. 24, 241. 1921.
[3]) Ebendaselbst 28, 201, 1922.

NH_3-N und Ur^+-N aufgearbeitet und das spezifische Gewicht der Leber bestimmt. Die organ-chemischen Untersuchungen zeigen als Hauptveränderungen im ersten Vergiftungsstadium einen Eiweißzerfall, im Endstadium ein hochgradiges Leberödem an. Durch Bestimmung des Wassergehalts wird einwandfrei bewiesen, daß die blasige Entartung ein Zellödem darstellt. Ein Vergleich der Resultate der quantitativen Aufarbeitung von mit Chl. N. Pr. vergifteten Lebern mit anderen pathologischen Lebern zeigt, daß die hier beschriebene Leber in ihrer Zusammensetzung am ehesten der akuten gelben Leberatrophie gleicht.

Phytochemische Reduktion von Chinonen.

Von

H. Lüers und J. Mengele.

(Aus dem Laboratorium für angewandte Chemie der Technischen Hochschule in München.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1926.)

Die schon frühzeitig von *Lintner* und *Liebig*[1]) am Furfurol und von *Lintner* und *Lüers*[2]) am Chloralhydrat experimentell mit Hilfe gärender Hefe durchgeführten phytochemischen Reduktionen fanden erst ihre theoretische Erklärung seit der Prozeß der alkoholischen Gärung im wesentlichen durch die Arbeiten *C. Neubergs* und seiner Mitarbeiter aufgeklärt worden war. Das beim Abbau der Hexosen durch Hefe intermediär auftretende Methylglyoxal bzw. seine Hydratform liefert bei der Dehydrierung aktiven Wasserstoff, der bei der normalen alkoholischen Gärung den Acetaldehyd in Äthylalkohol überführt oder bei Zusatz eines reduzierbaren Körpers aber auch von diesem aufgenommen werden kann. Der phytochemisch reduzierte Körper vertritt in diesem Falle an Stelle von Acetaldehyd die Rolle des Akzeptors für den aktiven Wasserstoff, vorausgesetzt, daß er in energetischer Beziehung mit dem Gärungsacetaldehyd in Konkurrenz treten kann.

Ein als Wasserstoffakzeptor geeigneter Körper kann, von Anfang an der Gärung zugesetzt, sogar aktivierend auf dieselbe wirken, bis eine gewisse Menge des natürlichen Akzeptors Acetaldehyd gebildet ist. Derartige Fälle sind von *C. Neuberg*[3]) und *T. Soda*[4]) eingehend studiert worden.

In der Folgezeit wurde das Gebiet der phytochemischen Reduktion von *C. Neuberg* und zahlreichen Mitarbeitern systematisch bearbeitet

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 449, 1911.

[2]) Ebendaselbst 88, 122, 1913.

[3]) Diese Zeitschr. 71, 135, 1915; 88, 145, 1918; **101**, 239 und 276, 1920; **109**, 290, 1920; **126**, 153, 202, 1921.

[4]) Ebendaselbst **135**, 610, 1923.

und auf diesem Wege eine große Zahl von Aldehyden, Ketonen, Nitro- und Schwefelverbindungen[1]) reduziert.

Über die Reduzierbarkeit der Chinone liegen Beobachtungen von *C. Neuberg* gelegentlich der bereits erwähnten Studien über die Aktivatoren der Gärung vor, doch wurden Reduktionsprodukte nicht isoliert. Nach Abschluß des experimentellen Teiles der vorliegenden Arbeit erschien eine Mitteilung von *C. Neuberg* und *E. Simon*[2]), in welcher über die Reduktion von p-Xylochinon zum entsprechenden Hydrochinon berichtet wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, einige Chinone auf ihre phytochemische Reduzierbarkeit zu prüfen. Von Interesse erschienen derartige Studien, weil bei der Erforschung des Wesens der Oxydoreduktion Verbindungen mit chinoidem Kern vielfach als Wasserstoffakzeptoren dienten [*H. Wieland*[3])]. Auch in der Natur finden sich Verbindungen von chinoidem Charakter, von *Palladin*[4]) als Atmungspigmente bezeichnet, die bei Atmungsvorgängen als Wasserstoffakzeptoren fungieren.

Über den Verlauf der Versuche ist im allgemeinen folgendes zu sagen:

Wurde beim Zusatz der Chinone zu dem in lebhafter Gärung befindlichen Ansatz mit der nötigen Vorsicht verfahren, so wurde die Gärung dadurch gar nicht oder nur wenig gehemmt. Trat ein Aussetzen der Gärung ein, so erholte sie sich, wenn der Chinonzusatz unterbrochen wurde, meist von selbst wieder, oder sie konnte durch Zugabe von neuer Hefe und Vermehrung des Flüssigkeitsvolumens leicht wieder in Gang gebracht werden. Meist wurden für die Reduktion von 5 g Chinon 2 bis 3 Liter Gäransatz, der aus 10proz. Rohrzuckerlösung (Brunnenwasser) bestand, verwendet. Im Laufe der Versuche stellte sich als weitaus bestes Verfahren das sogenannte Zulaufverfahren heraus, mit dessen Hilfe auch die Reduktion von sonst hartnäckig widerstehenden Chinonen glatt gelang. Bei diesem Verfahren versetzt man zunächst die gesamte Hefemenge mit einem kleinen Teile der Zuckerlösung in lebhafte Gärung und läßt dann den Gäransatz langsam

---

[1]) Wichtigste Literaturangaben über phytochemische Reduktionen. Diese Zeitschr. **52**, 494, 1913; **59**, 183, 1914; **60**, 472, 1914; **61**, 184, 1914; **62**, 470, 477, 482, 1914; **67**, 18, 24, 46, 104, 111, 1914; **71**, 114, 175, 1915; **90**, 388, 1918; **91**, 257, 1918; **92**, 96, 111, 1918; **103**, 315, 1920; **112**, 213, 1920; **138**, 560, 1923; **151**, 48, 1924; **156**, 54, 1925; Ber. **47**, 2264, 1914; **52**, 2237, 2248, 1919; Zeitschr. f. phys. Chem. **72**, 449, 1911.

[2]) Diese Zeitschr. **171**, 256, 1926.

[3]) Ber. **45**, 2606, 1912; **46**, 3327, 1913; **47**, 2085, 1914; **54**, 2353, 1921; Liebigs Ann. **431**, 301, 1923; **436**, 185, 229, 1924; Ber. **55**, 3639, 1922.

[4]) Diese Zeitschr. **27**, 442, 1910; **49**, 381, 1913.

im Laufe von 8 bis 12 Stunden den Hauptteil der Zuckerlösung, in welcher das Chinon gelöst oder so fein als möglich suspendiert wurde, zufließen.

Die Farbe der zugesetzten Chinone verschwand jeweils rasch, in manchen Fällen trat vorübergehend jene des entsprechenden Chinhydrons auf. Als Hefe hat sich untergärige gegenüber der obergärigen infolge ihrer größeren Unempfindlichkeit gegenüber den in größerer Menge giftig wirkenden Chinonen besser bewährt. Meist wurde die Hefe durch die Chinone nicht verändert. In einigen Fällen war ein großer Teil der Zellen plasmolysiert, was bei der Aufarbeitung der Versuche störend wirkte.

Die Isolierung der gebildeten Hydrochinone erfolgte entweder durch Ausäthern der filtrierten, abgegorenen Lösung, oder durch Benzoylierung der durch Eindampfen konzentrierten, vom Alkohol befreiten Flüssigkeit. Die Ausbeuten an Reduktionsprodukt betrugen in den günstigsten Fällen 60 bis 65 Proz. der Theorie.

Den Nachweis, daß die Reduktion der Chinone tatsächlich durch den bei der Gärung auftretenden aktiven Wasserstoff erfolgt, suchten wir dadurch zu erbringen, daß wir in einigen Fällen unter quantitativen Bedingungen Parallelversuche mit und ohne Chinon durchführten und eine exakte Alkohol- und Zuckerbilanz in den vergorenen Lösungen aufstellten. Es wurde tatsächlich in den mit Chinon versetzten Proben stets weniger Alkohol als in den Blindproben gefunden.

Folgende Chinone wurden auf ihre phytochemische Reduzierbarkeit untersucht:

p-Benzochinon. Bei seinem Zusatz zu dem gärenden Ansatz mußte sehr vorsichtig verfahren werden. Vorübergehend trat die Farbe des Chinhydrons auf. Das gebildete Hydrochinon konnte als solches in 45proz. Ausbeute und als Dibenzoylverbindung isoliert werden.

Thymochinon, das einzige in der Natur vorkommende Derivat des Benzochinons. Seine Reduktion gelang leicht und ohne jegliche Störung der Gärung. Auch hier erfolgte intermediär Bildung von Chinhydron, an der violetten Färbung des Gäransatzes zu erkennen. Das Thymohydrochinon wurde ebenfalls als solches wie auch in Form seiner Dibenzoylverbindung erhalten.

Bromanil. Die Gärung erlitt durch seinen Zusatz keine Störung. Die Bildung von Chinhydron konnte nicht beobachtet werden. Beim Bromanil gelang es erst nach wiederholten Versuchen, das Reduktionsprodukt, Tetrabromhydrochinon in 19proz. Ausbeute aus der Hefe zu isolieren.

Chinonmonoxim oder p-Nitrosophenol. Bei seinem Zusatz zur Gärung schien diese lebhafter zu werden. Als Reduktionsprodukte

waren hier p-Aminophenol und p-Oxyazobenzol zu erwarten. Trotz sorgfältigster Aufarbeitung konnte von letzterem keine Spur gefunden werden. Das p-Aminophenol konnte nur in Form seiner Dibenzoylverbindung gefaßt werden.

Chinondioxim. Es lieferte bei seiner glatt verlaufenden Reduktion p-Phenylendiamin, dessen Isolierung jedoch nur als Dibenzoat gelang.

Sowohl Chinonmonoxim als auch Chinondioxim erscheinen für Untersuchungen über den quantitativen Verlauf als am besten geeignet, da einesteils die Gärung trotz Zusatz verhältnismäßig großer Mengen nicht gestört wird, andererseits durch sie die Bildung der zwei- bzw. dreifachen Menge Alkohol als bei einem Chinon verhindert wird. Das Monoxim benötigt zur Reduktion zum Aminophenol 4 Atome H pro Molekül, das Dioxim zur Reduktion zum Phenylendiamin 6 Atome H pro Molekül, also entstehen durch ihren Zusatz 2 bzw. 3 Moleküle Alkohol weniger.

Das *Tetrabrom-o-chinon* wurde als beständigstes und am besten zugängliches o-Chinon der Reduktion unterzogen. Die Gärungen verliefen einwandfrei, das Tetrabrom-o-chinon war bei sämtlichen Versuchen nicht mehr aufzufinden, jedoch konnte weder das zu erwartende Tetrabrom-Brenzcatechin, noch sonst ein Reduktionsprodukt isoliert werden.

α-Naphthochinon. Die Gärung wurde von ihm nicht gehemmt. Die braune Farbe des Chinons verschwand nahezu vollständig, ohne daß eine Bildung von Chinhydron beobachtet werden konnte. Nach anfänglichen Schwierigkeiten konnte das α-Naphthohydrochinon in guter Ausbeute isoliert werden. Da es in alkalischer Lösung noch ziemlich beständig ist, wurde hier auch der Versuch der Benzoylierung unternommen. Die Ausbeute war jedoch so schlecht und die Reinigung so verlustreich, daß nicht entschieden werden konnte, ob das Mono- oder das Dibenzoat vorlag. Analog den anderen Benzoylierungen wird wohl das in der Literatur nicht angeführte Dibenzoat entstanden sein.

Das in den Schalen der Walnuß enthaltene *α-Juglon* wurde ohne Schwierigkeiten zum α-Hydrojuglon reduziert, dessen Isolierung wegen seiner Unbeständigkeit gegen Sauerstoff Schwierigkeiten bereitete. Erst beim Arbeiten im Kohlensäurestrom gelang es, Hydrojuglon in guter Ausbeute zu erhalten. Zur Reindarstellung wurde es sofort mit Essigsäureanhydrid behandelt und so die gut kristallisierte Triacetylverbindung isoliert.

Beim Zusatz von *α, β-Naphthochinon* erlitt die Gärung keinerlei Störung. Die Isolierung und Reinigung des α, β-Naphthohydrochinons gelang nach einigen vergeblichen Versuchen erst über die Diacetylverbindung.

Die Versuche zur Reduktion des *Anthrachinons* verliefen vollkommen negativ, trotzdem ein Ansatz während 6 Tagen in lebhaftester ununterbrochener Gärung erhalten wurde. Es war wohl eine ganz geringe Violettfärbung des Gäransatzes zu bemerken, die sich bei Zugabe von Natronlauge etwas vertiefte, also eine Veränderung von Anthrachinon vor sich gegangen, jedoch handelte es sich hier um so geringe Spuren, daß an eine Isolierung des Reduktionsproduktes nicht zu denken war. Im übrigen konnte aus der Hefe das Anthrachinon nahezu quantitativ zurückgewonnen werden.

Überraschenderweise gelang auch die Reduktion des *Phenanthrenchinons* zum Phenanthrenhydrochinon. Wegen seiner enormen Empfindlichkeit gegen Sauerstoff mußte im Kohlensäurestrom gearbeitet und das Phenanthrenhydrochinon sofort acetyliert werden. Die Ausbeute betrug 9 Proz., wobei das zum größten Teile unverändert am Boden des Gärgefäßes liegende Phenanthrenchinon nicht berücksichtigt wurde.

Experimentelles.

Reduktion von p-Benzochinon.

Gäransatz. 2 Liter 10proz. Rohrzuckerlösung + 200 g abgepreßte Brauereihefe, dazu innerhalb 7 Stunden 5 g Chinon in Wasser gelöst. Dann Zusatz von 150 g Zucker in 1300 ccm Wasser + 100 g Hefe und 12stündiges Aufbewahren im Brutschrank bei 25°. Am anderen Morgen nochmals 200 g Hefe, 200 g Zucker und 2 Liter Wasser + 5 g Chinon zugesetzt. Das Filtrat wurde auf 1 Liter eingeengt, mit Äther ausgeschüttelt und die ätherischen Auszüge auf 20 ccm abdestilliert. Der beim Abkühlen sich bildende Kristallbrei wird aus wenig Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Ausbeute 4,6 g Hydrochinon vom Schmelzpunkt 172°. Mischschmelzpunkt gab keine Depression.

3,978 mg Substanz: 9,558 mg CO_2, 1,990 mg H_2O.
$C_6H_6O_2$. Ber.: C = 65,45 Proz., H = 5,49 Proz.
Gef.: C = 65,53 „ H = 5,59 „

Bei einem zweiten ähnlichen Gäransatz mit 5 g Chinon wurde die vergorene filtrierte Lösung auf 250 ccm am Wasserbad eingeengt und Portionen von je 50 ccm mit je 5 g Benzoylchlorid und 50 ccm 10proz. NaOH geschüttelt. Die abzentrifugierten Niederschläge zeigten nach Umkristallisieren aus viel Benzol einen Schmelzpunkt von 199°, der dem Hydrochinondibenzoat entspricht.

3,797 mg Substanz: 10,550 mg CO_2, 1,550 mg H_2O.
$C_{20}H_{14}O_4$. Ber.: C = 75,50 Proz., H = 4,44 Proz.
Gef.: C = 75,77 „ H = 4,57 „

Reduktion von Thymochinon.

Gäransatz. 200 g Zucker in 2000 ccm Wasser gelöst + 200 g Hefe, dazu nach kräftiger Angärung 5 g Thymochinon gelöst in 25 ccm Alkohol innerhalb 4 bis 5 Stunden. Zur durch Chinhydronbildung tief gefärbten Lösung nochmals 50 g Zucker, 50 g Hefe und 250 ccm Wasser gegeben. Nach 24 Stunden war die Farbe des Chinhydrons völlig verschwunden.

Die über Kieselgur filtrierte Lösung (1 Liter) wurde ausgeäthert, der aus dem Ätherrückstand sich ausscheidende Kristallbrei dreimal aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 139,5°. Mischungspunkt mit Thymohydrochinon keine Depression. Ausbeute 59 Proz. der Theorie.

3,415 mg Substanz: 9,010 mg CO_2, 2,698 mg H_2O.
$C_{10}H_{14}O_2$. Ber.: C = 72,23 Proz., H = 8,49 Proz.
Gef.: C = 71,97 „ H = 8,84 „

Ein zweites Liter wurde nach dem Einengen benzoyliert. Das sich ölig abscheidende Benzoat konnte durch Verreiben mit Äther zum Erstarren gebracht werden. Nach Waschen mit viel Äther schmolz es unscharf bei 135 bis 140°.

3,532 mg Substanz: 9,960 mg CO_2, 1,960 mg H_2O.
$C_{24}H_{22}O_4$. Ber.: C = 76,98 Proz., H = 5,93 Proz.
Gef.: C = 76,91 „ H = 6,21 „

Reduktion von Tetrabrom-p-chinon.

200 g Zucker, gelöst in 2000 ccm Wasser, wurden mit 200 g Hefe in Gärung versetzt und unter dauerndem Turbinieren 6 g Tetrabrom-p-chinon, in 50 ccm Wasser aufgeschlämmt, zugegeben. Bei 25° C wurde unter dauerndem Rühren, um ein Absetzen des Chinons zu verhindern, vergoren und bei Verlangsamung der Gärung zweimal noch je 50 g Zucker in 250 ccm Wasser + 50 g Hefe zugesetzt. Nach 5 Tagen wurde von der Hefe abgehebert, diese abgesaugt, mit Wasser kurz gewaschen und im Faust-Heimapparat getrocknet. Nach Extraktion der Hefe mit Äther schieden sich aus dem Ätherrückstand schwach grün gefärbte Kristalle ab, die nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Eisessig bei 244° schmolzen. Keine Depression des Gemisches mit Tetrabromhydrochinon. Ausbeute 20 Proz.

0,2206 g Substanz: 0,3878 AgBr.
$C_6H_2O_2Br_4$. Ber.: Br 75,09 Proz.
Gef.: Br 74,81 „

Reduktion von Chinonmonoxim.

200 g Zucker in 2 Liter Wasser + 200 g Hefe wurden innerhalb 2 Stunden mit 10 g Chinonmonoxim in 200 ccm Wasser versetzt. Die Gärung schien lebhafter zu werden. Nach 5 Stunden Zusatz von 50 g Zucker, 50 g Hefe und 300 ccm Wasser, desgleichen nach 24 Stunden. Die Isolierung des Reduktionsprodukts gelang nach mehreren vergeblichen Versuchen schließlich nur durch Benzoylierung der unter HCl-Zusatz eingeengten filtrierten Lösung. Das rohe Benzoat lieferte nach Umkristallisieren aus Chloroform unter Zusatz von Tierkohle 6 g farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 231°. Schmelzpunkt des Dibenzoyl-p-aminophenols 231°. Ausbeute 40 Proz. der Theorie.

5,714 mg Substanz: 0,2323 ccm N (18°, 721 mm).
$C_{20}H_{15}O_3N$. Ber.: N = 4,42 Proz.
Gef.: N = 4,52 „

3,370 mg Substanz: 8,330 mg CO_2, 1,510 mg H_2O.
$C_{20}H_{15}O_3N$. Ber.: C = 75,69 Proz., H = 4,77 Proz.
Gef.: C = 75,50 „ H = 5,02 „

Reduktion von Chinondioxim.

300 g Hefe und 1½ Liter 10proz. Zuckerlösung ließ man kräftig angären und setzte dann aus dem Tropftrichter langsam 1½ Liter 10proz. Zuckerlösung, in der 4 g Chinondioxim durch Verreiben mit Quarzsand sehr fein verteilt waren, langsam innerhalb 10 Stunden zu. Das Filtrat wurde eingeengt und in üblicher Weise in Portionen benzoyliert. Nach Umkristallisieren aus viel Alkohol erhielt man das p-Phenylendiamin in Form farbloser Kristalle vom Schmelzpunkt nicht unter 300° in einer Ausbeute von 62 Proz.

4,100 mg Substanz: 11,390 mg CO_2, 1,940 mg H_2O.
$C_{20}H_{16}O_2N_2$. Ber.: C = 75,92 Proz., H = 5,10 Proz.
Gef.: C = 75,76 „ H = 5,30 „

Reduktion von a-Naphthochinon.

Zu einem Göransatz von 400 g untergäriger Hefe und 2 Liter 10proz. Zuckerlösung ließ man 2 Liter der gleichen Zuckerlösung, in der 4 g a-Naphthochinon sehr fein verteilt waren in 8 Stunden zutropfen, dann wurde noch 24 Stunden bei 25° stehengelassen. Das Filtrat wurde mit Äther erschöpft, nach Abdestillieren des Äthers schieden sich farblose Kristalle aus, die nach Umkristallisieren aus viel Benzol bei 189° schmolzen. Der Mischschmelzpunkt mit a-Hydronaphthochinon zeigte keine Depression. Ausbeute 65 Proz.

3,927 mg Substanz: 10,810 mg CO_2, 1,940 mg H_2O.
$C_{10}H_8O_2$. Ber.: C = 74,98 Proz., H = 5,04 Proz.
Gef.: C = 75,08 „ H = 5,18 „

Reduktion von a-Juglon.

200 g Hefe + 1 Liter 10proz. Zuckerlösung, dazu aus Tropftrichter 1 Liter Zuckerlösung, in welcher 4 g a-Juglon aufgeschlämmt war. Zuletzt noch 500 ccm Zuckerlösung und Stehen über Nacht bei 25° C.

Um Oxydation des Hydrojuglons zu verhindern, wurde die vergorene Lösung dauernd unter einer Ätherschicht aufbewahrt. Das Filtrat wurde ausgeäthert und die ätherische Lösung im Vakuum eingedampft. Der mit Chloroform gründlich gewaschene, grünliche, kristalline Rückstand wurde nach Trocknen mit 5 ccm Essigsäureanhydrid 1 Stunde im Bombenrohr auf 145° C erhitzt. Das Acetylierungsprodukt schmolz nach öfterem Umkristallisieren aus wenig Alkohol bei 128°. Schmelzpunkt des Triacetylhydrojuglons 128 bis 129°. Ausbeute 25 Proz. In einem anderen Versuch, wo im CO_2-Strom gearbeitet wurde, stieg sie auf 40 Proz.

3,980 mg Substanz: 9,240 mg CO_2, 1,760 mg H_2O.
$C_{16}H_{14}O_6$. Ber.: C = 63,56 Proz., H = 4,67 Proz.
Gef.: C = 63,32 „ H = 4,95 „

Reduktion von a-β-Naphthochinon.

200 g untergäriger Hefe + 1 Liter 10proz. Zuckerlösung wurden in lebhafte Gärung versetzt und *sehr vorsichtig* 1½ Liter der gleichen Zuckerlösung, in der 4,5 g a-β-Naphthochinon fein verteilt waren, zugesetzt. Nach 24 Stunden wurde im CO_2-Strom abfiltriert und das Filtrat ausgeäthert. Der Äther hinterließ rotbraune, nicht zur Kristallisation zu bringende Schmieren, welche auf die Haut ätzend wirkten (a-β-Naphtho-

hydrochinon). Nach nochmaligem Lösen in Äther, Trocknen mit $CaCl_2$ und Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand mit Essigsäureanhydrid und Na-Acetat acetyliert und das Rohacetat aus wenig Alkohol umkristallisiert. Ausbeute 13,5 Proz. auf Hydronaphthochinon berechnet. Schmelzpunkt 103°. Mischschmelzpunkt mit α-β-Hydronaphthochinondiacetat keine Depression.

3,315 mg Substanz: 8,397 mg CO_2, 1,526 mg H_2O.

$C_{14}H_{12}O_4$. Ber.: C = 68,83 Proz., H = 4,96 Proz.
Gef.: C = 69,08 „ H = 5,15 „

Reduktion von Anthrachinon.

Zu 200 g Hefe + 1 Liter 10proz. Zuckerlösung wurden 5 g Anthrachinon in 1 Liter Zuckerlösung suspendiert gegeben. Durch wiederholten Zusatz von Zuckerlösung wurde der Gäransatz 6 Tage in kräftigster Gärung gehalten. Aus der im CO_2-Strom abfiltrierten Lösung konnte durch Äther nichts erhalten werden. Aus der Hefe ließen sich durch Äther 4,6 g unverändertes Anthrachinon zurückgewinnen.

Reduktion von Phenanthrenchinon.

300 g Hefe wurden mit 1 Liter 10proz. Zuckerlösung in kräftige Gärung versetzt und innerhalb 8 Stunden langsam 2 Liter der Zuckerlösung, in der 4,5 g Phenanthrenchinon sehr fein verteilt waren, zufließen gelassen. Nach 24 Stunden erfolgte die Aufarbeitung im CO_2-Strom unter Abhaltung von Luft. Die nur abgeheberte Flüssigkeit wurde ausgeäthert, der Äther im CO_2-Strom abdestilliert, der Rückstand mit Wasser, das mit CO_2 gesättigt war, versetzt, abgesaugt und gewaschen. Nach Trocknen über Schwefelsäure wurde acetyliert und, da das Acetylprodukt noch etwas unverändertes Phenanthrenchinon enthielt, mit kalt gesättigter Na-Bisulfitlösung am Wasserbad kurz erwärmt. Der ungelöste Rückstand wurde mit Wasser gewaschen und aus Benzol umkristallisiert. Farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 202°. Mischschmelzpunkt mit Diacetylphenanthrenhydrochinon keine Depression. Ausbeute an Phenanthrenhydrochinon 9 Proz.

3,610 mg Substanz: 9,711 mg CO_2, 1,556 mg H_2O.

$C_{18}H_{14}O_4$. Ber.: C = 73,45 Proz., H = 4,79 Proz.
Gef.: C = 73,36 „ H = 4,82 „

Kontrollversuche zur Ermittlung der Alkohol- und Zuckerbilanz.

Es wurde eine große Anzahl diesbezüglicher Versuche durchgeführt, von denen hier nur einige Beispiele mitgeteilt seien.

Chinonmonoxim.

Ansatz. 20,000 g Hefe + 50,0 ccm 10proz. Zuckerlösung, dazu 0,390 g Chinonmonoxim, in 50 ccm 10proz. Zuckerlösung gelöst, langsam zugesetzt und mit 55 ccm Wasser nachgespült. Die Gärung erfolgte in geschlossenen, mit Gärverschluß versehenen Gärkölbchen. Nach 48 Stunden wurde abfiltriert und mit Wasser bis auf 250 ccm nachgewaschen.

Zur Alkoholbestimmung wurden 75 g Filtrat mit 5 ccm 10proz. Natronlauge und 15 ccm 10proz. Natriumbisulfitlösung, um Spuren von Acet-

aldehyd zurückzuhalten, versetzt und 50 ccm in ein Pyknometer destilliert. Alkoholgehalt 1,956 Proz.

Zur Bestimmung des noch vorhandenen Zuckers wurden 75 ccm (74,68 g) des Filtrats mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, auf 5 ccm eingeengt, dazu 10 ccm Bleiessig, aufgefüllt auf 25 ccm, vom Filtrat 10 ccm mit schwefliger Säure versetzt, auf 25 ccm aufgefüllt und nach dem Filtrieren polarisiert. Linksdrehung im 1-dm-Rohr = — 0,035°, entsprechend 0,148 Proz. Invertzucker oder 0,078 Proz. Alkohol.

Beim Parallelversuch ohne Chinonmonoxim, der sonst ganz gleich durchgeführt wurde, wurden 2,120 Proz. Alkohol gefunden. Der Zucker war vollkommen vergoren.

Ansatz mit Chinonmonoxim	1,956 Proz. Alkohol.
Dem unvergorenen Zucker entsprechen	0,076 „ „
Summa . . .	2,032 Proz. Alkohol
Ansatz ohne Chinonmonoxim	2,120 „ „
Differenz . .	0,088 Proz. Alkohol
Dem zugesetzten Chinonmonoxim entspräche ein Minus von	0,117 „ „

Chinondioxim.

Ansatz und Mengenverhältnisse wie oben. 0,5 g Chinondioxim aufgefüllt auf 200 ccm. 75 g Filtrat zur Alkoholbestimmung. Gefunden 1,783 Proz. Alkohol. Beim Kontrollversuch ohne Oxim 1,821 Proz. Alkohol.

Zuckerbestimmung des Versuchs mit Chinondioxim ergab keine Spur unvergorenen Zuckers. Der Versuch ohne Chinondioxim ergab wie oben verarbeitet 0,295 Proz. Invertzucker, entsprechend 0,151 Proz. Alkohol.

Ansatz ohne Chinondioxim	1,821 Proz. Alkohol
Dem unvergorenen Zucker entsprechen .	0,151 „ „
Summa . . .	1,972 Proz. Alkohol
Ansatz mit Chinondioxim	1,783 „ „
Differenz . .	0,189 Proz. Alkohol
Dem zugesetzten Chinondioxim entspräche eine Alkoholdifferenz von . .	0,250 „ „

Juglon.

20 g Hefe + 50 ccm 10proz. Zuckerlösung, dazu 0,31 g Juglon in 50 ccm 10proz. Zuckerlösung langsam zufließen lassen, nachgespült mit 60 ccm Wasser; nach 24 Stunden filtriert und mit Wasser auf 200 ccm nachgewaschen.

75 g Filtrat + 5 ccm 10proz. NaOH und 20 ccm 10proz. Natriumbisulfitlösung, davon 50 ccm in ein Pyknometer destilliert. Gefunden 2,166 Proz. Alkohol. Ein Parallelversuch ohne Juglon ergab 2,529 Proz. Alkohol.

Zur Zuckerbestimmung wurden 25 ccm Filtrat mit 1 ccm konzentrierter HCl invertiert, auf 100 ccm aufgefüllt, davon in 10 ccm nach *Kjeldahl-Bertrand* der Zucker bestimmt. Verbraucht 3,1 ccm $KMnO_4$ (f = 0,99075).

Daraus berechnet 0,627 Proz. Invertzucker oder 0,319 Proz. Alkohol. Beim Parallelversuch wurden 0,040 Proz. Invertzucker = 0,021 Proz. Alkohol gefunden.

Ansatz mit Juglon	2,166 Proz.	Alkohol
Dem unvergorenen Zucker entsprechen .	0,319 „	„
Summa . . .	2,485 Proz.	Alkohol
Ansatz ohne Juglon	2,529 „	„
Dem unvergorenen Zucker entsprechen .	0,021 „	„
Summa . . .	2,550 Proz.	Alkohol
Differenz . .	0,065 Proz.	Alkohol
Dem zugesetzten Juglon entspräche eine Differenz von	0,041 „	„

Die Gewinnung proteolytischer Bakterienenzyme aus flüssigen Bakterienkulturen mit Hilfe der Mastixfällung.

Von

M. Schierge.

(Aus der medizinischen Klinik zu Leipzig.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1926.)

Will man die Wirkungsweise der Bakterienproteasen untersuchen, so ist es notwendig, alle übrigen Funktionen der *lebenden* Bakterienzelle auszuschalten, weil sonst die durch enzymatische Hydrolyse entstehenden Eiweißspaltprodukte („Peptone", Aminosäuren) einen weiteren sekundären Abbau zu Aminen, Oxysäuren usw. erleiden.

Man kann die Einwirkung der lebenden Bakterienzelle dadurch beseitigen, daß man durch Tonkerzen filtriert und das bakterienfreie Kulturfiltrat auf das zu spaltende Protein einwirken läßt. Jedoch erscheint dieser Weg nicht empfehlenswert, weil, wie japanische Autoren nachgewiesen haben, wichtige Fermente (Polypeptidasen) durch das Tonkerzenfilter zurückgehalten werden. Außerdem ist ein Filtrieren von voluminösen Massenkulturen durch Tonkerzen lästig; auch ist es bei dieser Methode nicht möglich, die Proteasen zu konzentrieren.

Vor einiger Zeit konnte ich zeigen, daß man die Bakterienproteasen durch Adsorption an Casein gewinnen kann, indem man zur flüssigen Massenkultur eine Caseinlösung hinzufügt und darauf mit Essigsäure ausfällt[1]). Der Niederschlag, der nach Eintrocknen auf dem Filter mit Toluol durchtränkt wird, um die mitgerissenen Bakterien abzutöten, enthält die Bakterienproteasen von unbegrenzter Haltbarkeit.

Damals schon wies ich darauf hin, daß diese Methode für gewisse Versuche durch eine andere ersetzt werden müsse, die zu einem reineren Fermentsol führt, z. B. dann, wenn man die Einwirkung der Bakterienproteasen auf künstliche Polypeptide prüfen will. Da nämlich Polypeptide wegen ihrer Kostbarkeit meist nur in geringer Menge zur Ver-

---

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50**, 680, 1926 (daselbst ausführliche Literatur).

fügung stehen, arbeitet man bei derartigen Versuchen mit kleinen Flüssigkeitsmengen und möglichst konzentriertem Fermentsol. Hatte man nun die Proteasen durch Caseinadsorption auf die früher beschriebene Weise gewonnen, so macht sich bei einem stark konzentrierten Fermentsol ihre Wirkung auch auf das darin enthaltene Casein in erhöhtem Maße bemerkbar. Dadurch werden die Versuchsergebnisse unnötig kompliziert.

Aber aus einem anderen Grunde noch erschien eine Verbesserung der Enzymgewinnung wünschenswert. Will man nämlich die Endprodukte isolieren, die bei der Einwirkung der Bakterienproteasen auf bestimmte Proteine entstehen, so kann ebenfalls das im Fermentsol enthaltene Casein das Resultat beeinträchtigen. Untersucht man die Spaltung des Caseins selbst, dann stört das bereits vorhandene Casein natürlich nicht. Wählt man aber einen anderen Eiweißkörper, z. B. Seidenpepton, dann läßt sich streiten, ob die freien Aminosäuren, die sich aus dem Fermenthydrolysat isolieren lassen, auch wirklich dem Seidenpepton oder etwa dem Casein des Fermentsols entstammen. Dieses gilt z. B. von dem Tyrosin, welches sowohl im Casein als auch im Seidenpepton in reichlicher Menge vorhanden ist und von der Koliprotease aus dem Casein in deutlich nachweisbarer Menge abgespalten wird[1]).

Daher versuchte ich, die Bakterienproteasen anstatt an Casein an Mastix zu adsorbieren, indem eine wässerige Mastixemulsion der Bakterienkultur zugesetzt wurde. Wenn man danach den getrockneten Niederschlag mit Alkohol und Äther behandelt, so geht die Mastix in Lösung und die Bakterienproteasen samt Bakterienleiber bleiben zurück. Die Bakterien werden durch die Einwirkung des Alkohols abgetötet, soweit sie nicht schon durch das Antrocknen zugrunde gegangen sind. Man erhält auf diese Weise ein gut wirksames Dauertrockenpräparat von wesentlich größerer Reinheit als mit der Caseinfällungsmethode.

Nachdem die Methode an einer durch Luftkeime stark infizierten Peptonlösung ausprobiert worden war, wandte ich sie bei einer Massenkultur von Kolibakterien an. Zur speziellen Erläuterung der Methode sei folgendes Protokoll wiedergegeben:

1 Liter Fleischwasserpeptonnährboden wird mit Bact. coli beimpft und 3 Tage bebrütet. Nachdem die üppig angegangene Kultur auf Reinheit geprüft war, wird sie sofort mit einer Mastixemulsion versetzt und schwach mit Essigsäure angesäuert. Die Mastixemulsion wurde frisch hergestellt durch Zusammengießen von 50 ccm einer 5proz. alkoholischen Mastixlösung und 50 ccm Wasser. Nach einem Tage hat sich ein reichlicher flockiger

[1]) Arbeit erscheint demnächst in der Zeitschr. f. d. ges. exper. Med.

Niederschlag abgesetzt. Filtrieren durch gewöhnliches Faltenfilter, Trocknen bei Zimmertemperatur. Das mit der Niederschlagskruste bedeckte steife Filter wird in ein entsprechend großes Becherglas sanft eingepreßt und unter Alkohol gesetzt. Auf diese Weise vermeidet man ein etwaiges Fortspülen des Niederschlags. Nachdem der Alkohol einige Male gewechselt worden war, wird er nach einigen Stunden durch Äther ersetzt. Dann wird das Filter herausgenommen und an der Luft getrocknet. Es hinterbleibt eine dünne, feste Niederschlagskruste mit den wirksamen Proteasen.

Für den Verdauungsversuch wird das Filter in großer Petrischale ausgebreitet und mit ganz schwach soda-alkalischem Wasser beschickt. Darauf quellen die Niederschlagskrusten auf und lassen sich spielend leicht mit einem Spatel vom Filter ablösen. Der abgelöste Niederschlag wird in ein Erlenmeyerkölbchen übergespült und durch Schütteln fein verteilt. Es ergeben sich 60 ccm „Fermentsol".

Dieses Fermentsol wird mit 50 ccm einer 5 proz. Wittepeptonlösung versetzt, mit n/10 HCl lackmusneutral gemacht und nach Zusatz von Xylol und Chloroform verkorkt in den Brutschrank gestellt. Täglich wird mit Hilfe der Bromwasserreaktion das Auftreten von freiem Tryptophan als Zeichen der fermentativen Peptonhydrolyse verfolgt. Bereits nach einem Tage war die anfänglich negative Bromwasserreaktion deutlich positiv, nach 2 Tagen fiel sie schon dunkelviolett aus, wie bei einer intensiven tryptischen Verdauung.

Ich versuchte auch, aus Menschenserum die Protease durch Mastixemulsion zu fällen, aber ohne guten Erfolg. Die Protease des menschlichen Blutserums spaltet aus Casein und Wittepepton ebenfalls freies Tryptophan ab[1]). Seinerzeit versuchte ich, die Serumprotease mit Alkohol zu fällen. Durch die weitgehende Denaturierung aber, die der Alkohol auf die genuinen Serumeiweißkörper entfaltet, war der erhaltene Eiweißniederschlag, der die Proteasen einschließt, zum großen Teil unlöslich geworden, so daß sich ein beträchtlicher Verlust an Protease ergab.

Ähnliche Verhältnisse fanden sich auch bei der Mastixfällung. Das hochmolekulare, genuine Serumeiweiß ist sehr empfindlich und wird schon durch das Eintrocknen auf dem Filter weitgehend denaturiert, so daß es seine Löslichkeit einbüßt und daher die in ihm eingeschlossenen Proteasen nur schwer in Lösung gelangen läßt. Auch feines Pulverisieren des getrockneten Niederschlags führte zu keinem besseren Erfolg. Digerierte ich mit dem durch Mastixfällung erhaltenen Serumeiweißpulver, welches in ganz schwach alkalischem Wasser aufgeschwemmt wurde, eine Wittepeptonlösung, so trat erst nach mehreren Tagen eine schwache Tryptophanreaktion auf.

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, 142; **34**, 442; **39**, 313.

Will man die Mastixfällung im Serum vornehmen, so benötigt man größere Mengen Mastixemulsion. Ein gutes Absetzen des Niederschlags erreicht man erst nach Zusatz von etwas Kochsalz in Substanz.

Zum Schluß sei erwähnt, daß *Brücke*[1]) bereits im Jahre 1874 eine analoge Methode der Enzymgewinnung angegeben hat. Er adsorbierte das Pepsin an Cholesterin und entfernte nachträglich das Cholesterin mit Äther. Dadurch erhielt er ein reineres Pepsinpräparat; die Cholesterinadsorption hat später *Willstätter*[2]) auch bei Lipasen angewandt.

---

[1]) *Brücke*, Vorlesungen über Physiologie 1, 294, 1874 (zitiert nach *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen 1, 49. Leipzig 1925).
[2]) *Willstätter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 125, 93 und 132, 1923.

Vergleichende Blutzucker-Untersuchungen an kapillärem und venösem Blute bei Gesunden, Hypertonikern und Luetikern.

Von

M. Dörle und W. Frank.

(Aus der medizinischen Universitäts-Poliklinik Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1926.)

Nach den Untersuchungen von *Löwy* (1916) und ferner von *Hirsch* (1916) unterliegt der Blutzuckerspiegel, untersucht am Kapillarblut (Fingerbeere), beim normalen Stoffwechselgesunden bestimmten Tagesschwankungen; und zwar ist er morgens nüchtern niedrig, steigt nach dem Frühstück an, um vor der Hauptmahlzeit wieder etwas zu sinken, und erreicht seine höchsten Werte einige Stunden nach dem Mittagessen.

Da das Kapillarblut im wesentlichen wohl dem arteriellen Abschnitt, d. h. dem präkapillaren Blute angehört, im eigentlichen Kapillargebiet aber stoffliche Austauschverhältnisse zwischen Blut und Gewebsflüssigkeit in Betracht kommen, war damit zu rechnen, daß im abfließenden Venenblut andere Blutzuckerwerte zu finden wären. Dies um so mehr, als *Landois* schon 1880 über Unterschiede des Blutzuckers im arteriellen und venösen Blute berichtet. Er fand den Blutzucker im arteriellen Blute erhöht. *Albertoni* (1914) fand beim Hunde im arteriellen Blute einen Blutzuckerwert von 1,1 bis 1,4, im venösen von 1,02 bis 1,09 pro Mille. *Bierry* und *Faudars* (1914) untersuchten beim Hunde und Pferde den Blutzuckergehalt in Carotis und Jugularisblut, und fanden den Blutzuckergehalt des Jugularisbluts höher als in der Carotis. *Wertheimer* (1923) bestimmte den Blutzucker im arteriellen und venösen Blute bei Diabetikern und Stoffwechselgesunden, bei Gesunden waren deutliche Differenzen, bei Diabetikern nahezu identische Werte.

Die vorliegenden Untersuchungen, die bei Gesunden, Hypertonikern und Luetikern angestellt wurden, sollen einen kurzen Überblick geben über die Differenz zwischen dem kapillären Blute der Fingerbeere und dem venösen der Cubitalvene. Und zwar wurden untersucht: Die Nüchternwerte, die Werte nach dem Frühstück und die Werte nach der Hauptmahlzeit. Die Blutzuckerbestimmungen wurden nach *Bang* ausgeführt. Diese Methode bestimmt die gesamten reduzierenden Substanzen des Blutes.

Die Tabelle I gibt die Werte bei vier normalen Versuchspersonen, bei denen zwei bzw. drei Untersuchungen an einem Tage vorgenommen worden waren. Wir bezeichnen mit „Differenz" den Unterschied der Werte in kapillärem und venösem Blute; und zwar bezeichnet + eine Differenz zugunsten des kapillären Blutes, — eine Differenz zugunsten des venösen Blutes.

Tabelle I.

Versuchspersonen	Zeit	Kapillarer Blutzucker Proz.	Venöser Blutzucker Proz.	Differenz Proz.
1	Nüchtern	0,103	0,071	+ 0,032
	2 Stunden nach dem Frühstück	0,120	0,068	+ 0,052
	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,130	0,071	+ 0,059
2	Nüchtern	0,121	0,121	± 0
	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,185	0,128	+ 0,057
3	Nüchtern	0,100	0,110	— 0,010
	2 Stunden nach dem Frühstück	0,178	0,130	+ 0,048
4	Nüchtern	0,123	0,125	— 0,002
	2 Stunden nach dem Frühstück	0,145	0,120	+ 0,025
	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,166	0,135	+ 0,031

Diese Untersuchungen zeigen, daß die Differenz zwischen Kapillarblut und Venenblut morgens nüchtern am geringsten ist, und daß sie sich nach Nahrungsaufnahme erheblich vergrößert. Sie zeigen ferner ein zwar deutliches Schwanken der Kapillarblutwerte, ganz übereinstimmend mit den Untersuchungen von *Löwy* und *Hirsch*, aber eine merkwürdige Konstanz der Werte des venösen Blutes. In Ergänzung dieser ersten Untersuchungen wurde bei einer Reihe weiterer Versuchspersonen jeweils zu verschiedenen Tageszeiten untersucht.

Tabelle II.

Versuchspersonen	Zeit	Kapillarblut Proz.	Venenblut Proz.	Differenz Proz.
Frau *M.*	Nüchtern	0,073	0,080	— 0,007
„ *Kl.*		0,159	0,152	+ 0,007
„ *V.*		0,158	0,159	— 0,001
„ *W.*	2 Stunden nach dem Frühstück	0,104	0,080	+ 0,024
Herr *X.*		0,133	0,103	+ 0,030
Frau *Ki.*		0,221	0,182	+ 0,039
„ *M.*	3 Stunden nach dem Frühstück	0,115	0,104	+ 0,011
Herr *v. W.*		0,070	0,056	+ 0,014
Frl. *Konz.*	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,131	0,080	+ 0,051
„ *Bian.*		0,165	0,123	+ 0,042

Auch aus der Tabelle II ist zu ersehen, daß die Differenz zwischen Kapillarblut und Venenblut morgens nüchtern am kleinsten ist, die Werte liegen hier, wie bei Tabelle I, sehr nahe bei ± 0, 2 Stunden nach dem Frühstück hat sich die Differenz erheblich vergrößert, bei den beiden Personen, die 3 Stunden nach dem Frühstück zur Untersuchung kamen, ist die Differenz wieder etwas kleiner. Die höchsten Werte finden sich hier, wie bei Tabelle I, 3 Stunden nach dem Mittagessen. Die Werte liegen hier zwischen + 0,031 und + 0,059, sind also zugunsten des Kapillarbluts erhöht.

Tabelle III zeigt Untersuchungen, die bei Hypertonikern ausgeführt wurden. Die Blutdruckwerte schwanken zwischen 165 mm Hg und 280 mm Hg systolischem Blutdruck.

Eine Hyperglykämie bei Hypertension wurde von einer Reihe Autoren beschrieben. *Neubauer* (1910) nimmt an, daß bei nephritischer Hypertension eine Erhöhung des Blutzuckers parallel der Blutdruckerhöhung sich findet. *Härle* dagegen kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß sich bei nephritischen Prozessen in ungefähr der Hälfte der Fälle Blutzuckerwerte an den oberen Grenzen der Norm finden, daß bei essentiellen Hypertonien ungefähr ein Viertel der Fälle eine echte Hyperglykämie zeigt, ein zweites Viertel Werte an der oberen Grenze der Norm. Die übrigen zeigen normale Werte. Ein Parallelismus zwischen Blutdruckerhöhung und Blutzuckergehalt besteht nach seinen Untersuchungen nicht. Damit stimmen überein die Untersuchungen von *Kylin*, *Maranon*, *Kahler* und *Schwab*.

Bei den von uns untersuchten Hypertonikern haben fünf deutlich erhöhte Werte, und zwar zeigt sich diese Erhöhung sowohl am Kapillar- als auch am Venenblut. Bei den übrigen sind die Werte nicht als hyperglykämisch zu bezeichnen.

Tabelle III.

Name	Alter Jahre	Diagnose	Blutdruck	Zeit	Kapillarblut Proz.	Venenblut Proz.	Differenz Proz.
Herr *E.*	59	Arterioskler.	190/140	Nüchtern	0,111	0,112	— 0,001
Frau *F.*	65	„	230/145	Nüchtern	0,071	0,069	— 0,002
„ *S.*	73	„	200/100	2 Stunden nach dem Frühstück	0,062	0,055	+ 0,007
„ *G.*	65	„	200/110	2 Stunden nach dem Frühstück	0,092	0,095	— 0,003
Frl. *R.*	55	„	200/110	2 Stunden nach dem Frühstück	0,224	0,222	+ 0,002
Frau *F.*	60	Nierenskler.	280/200	2 Stunden nach dem Frühstück	0,208	0,200	+ 0,008
Frl. *K.*	66	Arterioskler.	230/110	3 Stunden nach dem Frühstück	0,110	0,098	+ 0,008
Frau *M.*	66	Nierenskler.	220/110	3 Stunden nach dem Frühstück	0,146	0,150	— 0,004
„ *D.*	—	„	190/75	3 Stunden nach dem Frühstück	0,123	0,126	— 0,003
Herr *D.*	85	Arterioskler.	210/100	3 Stunden nach dem Frühstück	0,088	0,106	— 0,018
„ *W.*	—	Periph. Art.	190/120	3 Stunden nach dem Frühstück	0,223	0,215	+ 0,008
„ *B.*	42	Hypertonie	170/100	3 Stunden nach dem Frühstück	0,098	0,096	+ 0,002
Frau *N.*	62	„	160/100	3 Stunden nach dem Frühstück	0,205	0,200	+ 0,005
„ *M.*	—	Arterioskler.	240/130	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,079	0,075	+ 0,004
„ *D.*	56	Nierenskler.	165/90	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,152	0,146	+ 0,006
Herr *Tr.*	78	Arterioskler.	200/100	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,184	0,183	+ 0,001
Frau *A.*	—	Beg. Nierensklerose	240/130	3 Stunden nach dem Mittagessen	0,193	0,099	— 0,006

Bei dieser Tabelle fällt auf, daß die Differenz zwischen Kapillarblut und Venenblut außerordentlich klein ist. Wir finden bei den Untersuchungen an den nüchternen Hypertonikern Differenzen zwischen — 0,003 und + 0,008; kein Unterschied gegenüber normalen, jüngeren Versuchspersonen. Diese Differenz vergrößert sich aber nach Nahrungsaufnahme nicht zugunsten des Kapillarbluts. 2 Stunden nach dem Frühstück untersucht, zeigt sie Werte zwischen 0,003 und + 0,008.

3 Stunden nach dem Frühstück halten sich die Werte zwischen — 0,008 und + 0,012. 3 Stunden nach dem Mittagessen schließlich haben wir Werte zwischen + 0,001 und + 0,006. Demgegenüber hat sich die Differenz beim Normalen bis zu + 0,059 vergrößert. Eine Parallelität zwischen dieser Differenz und dem Blutdruck läßt sich nicht feststellen. Ist der Blutzuckerwert im Kapillarblut erhöht, so findet sich auch ein entsprechend erhöhter Wert im venösen Blute; auch hier ist wieder ein deutlicher Unterschied gegenüber dem Normalen, bei dem sich der Blutzucker in der Kapillare nach Nahrungsaufnahme erhöht, während er in der Vene niedrig bleibt. Beim Hypertoniker dagegen gehen nach Nahrungsaufnahme höhere Werte in Kapillare und Vene parallel.

Tabelle IV umfaßt die Untersuchungen an einer Reihe von Patienten mit Lues. Auch hier wurde wieder nüchtern, nach dem Frühstück und nach der Hauptmahlzeit untersucht. Es ist jeweils in den Tabellen vermerkt, ob eine positive oder negative Wassermann- bzw. Doldreaktion vorlag.

Tabelle IV.

Name	Alter Jahre	Diagnose	Zeit	*Wassermann*	*Dold*	Kapillarblut Proz.	Venenblut Proz.	Differenz Proz.
Herr *L.*	45	Lues lat.	Nüchtern	++	++	0,055	0,118	— 0,063
„ *G.*	46	Tabes		+	+	0,059	0,116	— 0,057
„ *H.*	40	Aort. luet.		++	++	0,088	0,115	— 0,023
Frau *F.*	56	Aort. aneur.		++	++	0,106	0,146	— 0,040
„ *J.*	32	Lues lat.		—	—	0,084	0,088	— 0,004
Herr *S.*	36	Sek. Lues		—	++	0,189	0,209	— 0,020
Frau *H.*	51	„ „	2 Stdn. n. Frühst.	+	+	0,053	0,142	— 0,089
Herr *D.*	48	„ „		—	++	0,090	0,101	— 0,011
„ *K.*	28	Lues con.	3 Stdn. nach Mittag	+	++	0,190	0,204	— 0,014
„ *W.*	56	Sek. Lues		++	++	0,118	0,140	— 0,022
Frau *F.*	48	„ „		++	++	0,055	0,070	— 0,015

Aus der Tabelle IV ist zu ersehen, daß bei seropositiver Lues die Blutzuckerwerte des venösen Blutes größer sind als die des Kapillarbluts. Und zwar findet sich diese negative Differenz sowohl beim nüchternen Patienten als auch bei Patienten nach Nahrungsaufnahme. Sie scheint sich allerdings nach Nahrungsaufnahme etwas zu verringern. Während sie nämlich beim Nüchternen — 0,020 bis — 0,063 Proz. zeigt, sind die Werte nach Nahrungsaufnahme zwischen — 0,011 und — 0,022 Proz., nur ein Fall zeigt — 0,089 Proz. Fall 5 unterscheidet sich nicht nur in seiner negativen Wassermann- und Doldreaktion von den übrigen untersuchten Fällen, sondern auch dadurch, daß er nur eine Differenz von — 0,004 Proz. Nüchternwert aufweist. So kleine negative Differenzen fanden sich auch bei normalen nüchternen Versuchspersonen. Größere Differenzen, wie wir sie bei seropositiver Lues sehen, wurden bei Normalen und Hypertonikern nicht beobachtet.

Um nun festzustellen, ob eine solche negative Differenz eine spezifische Luesreaktion darstellt, oder ob sie sich bei anderen Erkrankungen auch findet, wurden noch eine Reihe weiterer Patienten mit verschiedenen Erkrankungen untersucht.

Tabelle V.

Fall	Alter Jahre	Diagnose	Zeit	Kapillarblut Proz.	Venenblut Proz.	Differenz Proz.
K.	56	Diabetes	Nüchtern	0,280	0,254	+ 0,026
R.	32	Anämie		0,096	0,091	+ 0,005
K.	32	Chr. Obst.		0,111	0,105	+ 0,006
S.	40	Anämie		0,140	0,140	± 0
H.	18	Tyreotox.		0,125	0,120	+ 0,005
T.	33	Psychose		0,170	0,163	+ 0,007
H.	38	Basedow	3 Stunden nach Frühstück	0,160	0,148	+ 0,018
B.	37	Ikterus Wa.		0,076	0,139	— 0,063
S.	50	Chron. Ikt.		0,192	0,171	+ 0,021
R.	32	Anämie		0,108	0,062	+ 0,056
S.	40	"		0,178	0,160	+ 0,018
T.	36	Tyreotox.		0,128	0,094	+ 0,034
S.	28	Tbc. Adn.		0,118	0,099	+ 0,029
M.	15	Prod. Tbc.		0,085	0,065	+ 0,020
B.	46	Herzinsuff.	3 Stdn. n. Mittagessen	0,183	0,173	+ 0,010
B.	11	Dystr. ad.		0,128	0,110	+ 0,018
R.	50	Tracheitis		0,076	0,055	+ 0,021

Sämtliche hier untersuchten Fälle verhalten sich wie normale Versuchspersonen; es zeigt sich eine sehr geringe, meist positive Differenz bei den Nüchternwerten, eine Erhöhung der Differenz zugunsten des Kapillarbluts nach Nahrungsaufnahme. Nur Fall 8 (Ikterus) zeigt eine Ausnahme; hier wird die Differenz negativ, ohne daß sich eine Lues nachweisen läßt. Dagegen zeigt Fall 9 (Ikterus) ein durchaus normales Verhalten.

Es war nun schließlich noch notwendig, festzustellen, wie die Verteilung des Blutzuckers im kapillären und venösen Blute auf Serum und Gesamtblut erfolgt, ob sich etwa hier bestimmte Differenzen ergeben, und ob sich die Verteilung nach Nahrungsaufnahme oder bei verschiedenen Erkrankungen ändert. Zu diesem Zwecke wurden bei drei gesunden Versuchspersonen die Blutzuckerwerte nüchtern und nach dem Frühstück im Gesamtblut und Serum getrennt bestimmt. Die Blutzuckerbestimmungen wurden sowohl im Kapillar- als auch im Venenblut ausgeführt.

Tabelle VI.

Fall	Zeit	Kapillares Blut Proz.	Kapillares Serum Proz.	Venenblut Proz.	Venenserum Proz.
1	Nüchtern	0,146	0,110	0,146	0,136
	2 Stunden nach Frühstück	0,158	0,126	0,145	0,128
2	Nüchtern	0,169	0,137	0,166	0,139
	2 Stunden nach Frühstück	0,184	0,138	0,170	0,142
3	Nüchtern	0,114	0,054	0,111	0,089
	2 Stunden nach Frühstück	0,122	0,052	0,114	0,087

Tabelle VII.

Nüchternwerte (Fortsetzung von Tabelle VI).

Fall	Alter Jahre	Diagnose	Kapillares Blut Proz.	Kapillares Serum Proz.	Venenblut Proz.	Venenserum Proz.
1. Frau *M.*	—	Arteriosklerose	0,104	0,088	0,102	0,089
2. „ *P.*	—	„	0,098	0,078	0,089	0,076
3. „ *F.*	50	Sekund. Lues	0,067	0,054	0,123	0,100
4. Herr *W.*	48	Lues 3. K.	0,087	0,062	0,114	0,098
5. Frau *R.*	32	Anämie pern.	0,098	0,082	0,096	0,081
6. Frau *Sch.*	40	Sek. Anämie	0,140	0,123	0,140	0,121

Die Tabelle VII zeigt, daß die Verteilung des Blutzuckers auf Gesamtblut und Serum sowohl beim Normalen als auch beim Kranken etwa im Verhältnis von 80 : 100 erfolgt. Ein Unterschied in dieser Verteilung läßt sich auch nach Nahrungsaufnahme nicht feststellen.

Wenn wir die Versuchsergebnisse noch einmal zusammenfassen, dann läßt sich also sagen: Bei gesunden Versuchspersonen besteht im nüchternen Zustand keine oder nur eine sehr geringe Differenz zwischen dem Blutzuckerwert im kapillären und im venösen Blute; nach Nahrungsaufnahme steigt der Blutzuckerwert im Kapillarblut stark an. Die Differenz wird positiv. Die fortlaufenden Untersuchungen an den vier ersten Fällen zeigen, daß die Blutzuckerwerte in der Vene fast konstant bleiben. (Bestätigung durch den ersten Teil von Tabelle VI.) Daraus folgt, daß im kapillären Gewebe der Verbrauch des Zuckers stattfindet. „Das Kapillarsystem ist der Ort stofflicher Umsetzungen zwischen Blut und Gewebe"; *Ziegler* 1924.

Ähnliche Austauschvorgänge für andere Blutbestandteile wurden schon beschrieben. Wir erinnern z. B. an die Untersuchungen von *Baggard* (1912) über den Eiweißgehalt des venösen und kapillären Blutes.

Bei Hypertonikern ist die Differenz zwischen venösem und kapillärem Blute, nüchtern untersucht, sehr klein ($\pm$ 0). Sie steigt nach Nahrungsaufnahme nicht, sondern bleibt unverändert niedrig. Daraus dürfte der Schluß zu ziehen sein, daß hier durch eine besondere Beschaffenheit der Kapillarwand oder der physikalisch-chemischen Blutzusammensetzung der Austausch zwischen Blut und Gewebe gehemmt wird.

Bei Luetikern ist die Differenz nüchtern und nach Nahrungsaufnahme negativ, und zwar bei den von uns untersuchten Fällen immer dann, wenn eine seropositive Lues vorliegt.

Wir sahen also in Bestätigung anderer Untersucher, daß beim normalen, nüchternen Menschen eine kaum ins Gewicht fallende Differenz zwischen dem Blutzuckergehalt des venösen und präkapillären arteriellen Blutes besteht. Nahrungszufuhr läßt ihn im arteriellen Teile ansteigen, im venösen ist die Erhöhung meist wieder zur Norm ausgeglichen. Die Hypertoniker, besonders nephropatischer Art, lassen diesen Ausgleich vermissen. In geringem Grade kann sogar eine Erhöhung des Blutzuckergehalts im venösen Teile eintreten. Er verhält sich in dieser Beziehung ähnlich wie beim Diabetiker. Bei Luetikern

mit positiver Seroreaktion ist die Erhöhung des Blutzuckergehalts im venösen Gefäßteil die Regel.

Wenn wir annehmen, daß der Normale imstande ist, erhöhte Zuckerzufuhr des Blutes im Kapillarsystem als dem Orte des Austauschs zwischen Blut und Gewebssaftelementen durch Abgabe an die Gewebssäfte bzw. Gewebszellen auszugleichen, so würde das Verhalten beim Hypertoniker und Luetiker, gelegentlich auch beim Ikterischen, darauf hindeuten, daß dieser Austausch einmal mehr oder weniger gehemmt oder verhindert, oder aber in eine gegenteilige Reaktion, Abgabe von Zucker an das Blut, umgewandelt wird.

Eine Veränderung in der Verteilung Serum bzw. Plasma und Blutkörperchen kommt zur Erklärung wohl nicht in Frage. Auch die Annahme kapillärer Wandschädigungen bei Hypertonie (*Kylin* 1926) und Lues (*Rost* 1926) bereitet der Erklärung größte Schwierigkeiten. Eher ist mit einer physikalisch-chemischen Veränderung des Blutes selbst zu rechnen, wodurch die osmotische Valenz des Blutzuckers mehr oder weniger gehemmt oder unwirksam gemacht bzw. vermindert wird, so daß eine Zuckeranreicherung stattfindet. Welche Faktoren dies bewirken, ist unklar. Um zu untersuchen, ob Lipoide (Cholesterin) dabei eine Rolle spielen,

Tabelle VIII.

Fall	Zeit	Dauer der Fütterung	Kapillarblut Proz.	Venenblut Proz.	Differenz Proz.
1. Herr *M.* vor Cholesterinzufuhr	Nüchtern	5 Tage	0,073	0,073	0
	2 Stdn. nach Frühstück		0,110	0,074	+ 0,036
Nach Cholesterinzufuhr	Nüchtern		0,076	0,072	+ 0,004
	2 Stdn. nach Frühstück		0,121	0,070	+ 0,051
2. Herr *H.* vor Cholesterinzufuhr	Nüchtern	5 „	0,119	0,111	+ 0,008
Nach Cholesterinzufuhr	„		0,169	0,161	+ 0,008
3. Vor Cholesterinzufuhr	„	8 „	0,110	0,108	+ 0,002
Nach Cholesterinzufuhr	„		0,098	0,096	+ 0,002
4. Vor Cholesterinzufuhr	„	5 „	0,099	0,101	— 0,002
Nach Cholesterinzufuhr	„		0,103	0,096	+ 0,007
5. Vor Cholesterinzufuhr	Nach Mittag	8 „	0,119	0,098	+ 0,021
Nach Cholesterinzufuhr	„ „		0,169	0,141	+ 0,028
6. Vor Cholesterinzufuhr	„ „	8 „	0,135	0,107	+ 0,028
Nach Cholesterinzufuhr	„ „		0,169	0,098	+ 0,071

wurde bei sechs normalen Versuchspersonen der Blutzuckergehalt vor und nach Cholesterinfütterung untersucht. Es wurden während 5 bzw. 6 Tagen täglich 0,3 g Cholesterin verfüttert, was nach früheren Untersuchungen eine Erhöhung des Cholesterinspiegels im Blute hervorrufen mußte (*Dörle* und *Sperling* 1924), wie er bei Lues häufig beobachtet wird.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß sich durch Cholesterinfütterung eine Erhöhung des Blutzuckers im Venenblut nicht erreichen läßt. In keinem der untersuchten Fälle verschiebt sich der Blutzuckergehalt im kapillären und venösen Blute zugunsten des venösen. Das Verhältnis des Kapillarblutzuckers zum venösen Blutzuckergehalt bleibt vollständig erhalten. Der sehr häufig erhöhte Lipoidgehalt im Blute von Luetikern (*Klein* und *Dinkin* 1914; *Stein*, *Pribram*, *Jakobi* 1915; *v. Weiss* und *Dörle* 1926) dürfte also zur Erklärung für das Auftreten einer Erhöhung des Blutzuckers in der Vene nicht ausreichen. Auch in vitro beeinflußt Cholesterin den Blutzucker des Serums nur unbedeutend. Wird eine Cholesterinemulsion frischem Serum im Reagenzglas zugesetzt und der Blutzuckergehalt des Serums vor und eine halbe Stunde nach Zusatz (vgl. *Freundlich* 1909) untersucht, dann zeigt sich, daß der Gehalt des Serums an Zucker nur ganz unbedeutend vermindert ist. Eine nennenswerte Adsorption hat nicht stattgefunden.

Alle unsere Untersuchungen beziehen sich auf einen Gefäßabschnitt der Peripherie mit relativer Ruhelage. Die Ergebnisse dieser Untersuchung dürften kaum für alle Stromgebiete die gleichen sein. In ihrer Regelmäßigkeit erhalten sie aber eine gewisse prinzipielle Bedeutung. Daß sie in anderen kapillären Stromgebieten nicht gleich verlaufen können, geht schon daraus hervor, daß der Blutzuckergehalt nicht weiter ansteigt, also der venöse, der Cubitalvene zuströmende Überschuß an Zucker bei Lues anderweitig eliminiert werden muß.

Zusammenfassung.

1. Beim normalen, nüchternen Menschen besteht eine sehr geringe Differenz zwischen den Blutzuckerwerten des venösen und kapillären Blutes. Nach Nahrungsaufnahme steigen die Blutzuckerwerte im Kapillarblut an, im Venenblut bleiben sie konstant. Die Differenz vergrößert sich zugunsten des Kapillarbluts, ist also positiv.

2. Beim Hypertoniker besteht nüchtern und nach Nahrungsaufnahme eine sehr geringe Differenz zwischen Kapillar- und Venenblut.

3. Bei seropositiver Lues sind nüchtern die Blutzuckerwerte im Venenblut bedeutend höher als im Kapillarblut. Nach Nahrungsaufnahme wird diese Differenz zwar kleiner, bleibt aber negativ. Die Differenz ist also bei Lues (auch bei Ikterus) zugunsten der Vene vergrößert, wird also negativ, so daß sich eine Umkehr des beim Normalen beobachteten präkapillar-venösen Blutzuckerverhältnisses findet.

Literatur.

1) *Albertoni*, Asher-Spiro 1914, S. 455. — 2) *W. Baggard*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. 10, 1911. — 3) *Bierry* und *Faudars*, Sammelref.; *J. Löwy*, Berl. klin. Wochenschr. 1917, S. 988. — 4) *M. Dörle* und *R. Sperling*,

Klin. Wochenschr. 1924, S. 1530. — 5) *E. Hirsch*, diese Zeitschr. **75**, 189, 1916. — 6) *Härle*, Zeitschr. f. klin. Med. 1921. — 7) *J. Jakoby*, Festschr. f. Prof. *Lechner*, 1915. — 8) *Kahler*, Arch. f. inn. Med. **4**, 119. — 9) *E. Kylin*, Die Hypertoniekrankheit, 1926. — 10) *W. Klein* und *L. Dinkin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 1914. — 11) *Landois*, Lehrb. d. Physiol. 1880. — 12) *J. Löwy*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1916. — 13) *Maranon*, Zeitschr. f. klin. Med. **96**, 1 bis 3. — 14) *Neubauer*, diese Zeitschr. **25**, 1910. — 15) *Schwab*, Virchows Arch. **241**, H. 1/2. — 16) *Stein*, Zeitschr. f. exper. Med. **8**, 1914. — 17) *Stepp*, Zeitschr. f. phys. Chem. **107**, 1919. — 18) *M. Wertheimer*, Klin. Wochenschr. 1923, S. 2362. — 19) *v. Weiss* und *M. Dörle*, diese Zeitschr. **171**, 225, 1926. — 20) *K. Ziegler*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 1481.

Über die Frage der Existenz rein desaggregierender Enzyme.

Von

Carl Oppenheimer, Berlin.

(Eingegangen am 18. Oktober 1926.)

Ich habe in meiner Monographie: „Die Fermente und ihre Wirkungen" an mehreren Stellen, sowohl bei den Enzymen der Polyosen wie bei den Proteasen, die Möglichkeit diskutiert, daß es für den ersten Akt des Angriffs dieser hochmolekularen Aggregate eine ganz besondere Art von Enzymen gäbe, nämlich solche, die nichts anderes bewirken als *Einzwängung von Hydratwasser* mit dem Erfolg, daß die großen Komplexe in ihre relativ einfachen Grundkörper auseinanderfallen. Diese Enzyme wären solche eines neuen Typs, nämlich „Hydratasen", im Gegensatz zu den bekannten Hydrolasen.

Ich wurde trotz sehr großer theoretischer Bedenken zu dieser Annahme hingeführt, weil sowohl bei den Polyosen wie bei den Proteinen alles darauf hinzudeuten schien, daß der erste Akt des Angriffs tatsächlich nichts anderes ist als ein Zerfall großer Aggregate in die scheinbar unveränderten Grundkörper, an denen dann erst die spezifisch chemisch wirksamen Enzyme des weiteren Abbaues angreifen sollten.

Diese Annahme hat Widerspruch gefunden, z. B. durch *Waldschmidt-Leitz* in den Naturwiss. 1926, H. 8. Da nun meine „Fermente" ja ziemlich weit verbreitet sind und öfters als Beleg herangezogen werden, so könnte sich diese Diskussion weiter hinziehen. Dies ist aber insofern überflüssig, als ich die *Annahme der Existenz rein desaggregierender Enzyme nicht mehr für nötig halte.* Dies zu betonen, ist der Zweck dieser kurzen Mitteilung.

Der Hauptgrund dafür ist bei den Polyosen der, daß nach den Ergebnissen von *Pringsheim*, *Bergmann*, *Kuhn* u. a. unzweifelhaft die erhaltenen Abbauzwischenstoffe nicht mehr die unveränderten Grundkörper sind; es geht also beim Abbau von vornherein eine chemische Veränderung der Desaggregation parallel. Wahrscheinlich

ist die *Kuhn*sche Annahme richtig, daß die Fähigkeit der Assoziation eben an den Feinstrukturen haftet, wie sie im natürlichen Stärkekomplex gegeben sind, daß diese Fähigkeit also erlischt, wenn sich die Körper chemisch umwandeln, und daß damit der *Zerfall der Aggregate eine spontan eintretende Folge chemischer Umwandlungen ist.* Auch bei den Proteinen treten nach den neueren Arbeiten von *Waldschmidt-Leitz*, *Steudel* u. a. wohl schon sofort beim ersten Akt an dem Proteinkomplex chemische Änderungen auf, die ihrerseits erst Aufhebung der Assoziation zur Folge haben, so daß auch hier die *Annahme reiner Hydratasen nicht mehr notwendig ist.*

Bestimmung freier und gebundener Benzoesäure mit der Schaukelextraktionsmethode.

Von

Erik M. P. Widmark.

(Medizinisch-chemisches Institut, Lund.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Im *Skandinavischen Archiv für Physiologie*[1]) wurde neulich eine neue Methode zur quantitativen Extraktion von Flüssigkeiten veröffentlicht, die bei Analysen, die mit Extraktionen verbunden sind, sich als besonders vorteilhaft erwiesen hat.

Unter Hinweis auf die Einzelheiten in obengenannter Publikation sei hier nur in Kürze das Prinzip dieser neuen Form von Extraktion, die ich „Schaukelextraktion“ nenne, mitgeteilt.

Der Apparat besteht aus zwei, durch eine breite Kommunikation verbundenen Scheidetrichtern mit möglichst flachen Böden. Der Glasapparat wird in einem beweglichen Stativ befestigt, das durch einen kleinen elektrischen Motor in eine regelmäßig langsam schaukelnde Bewegung versetzt wird, wodurch ein im Apparat befindliches Extraktionsmittel abwechselnd von einem in den anderen Scheidetrichter dekantiert wird, während die an den Böden der Gefäße befindlichen schwereren Lösungen nicht miteinander in Berührung gelangen. Bei Extraktion von Säure aus Harn soll die Neigung des Apparats zu jeder Seite der Horizontalebene ungefähr 18° erreichen, und eine ganze Schaukelperiode soll eine Zeit von etwa 25 bis 27 Sekunden in Anspruch nehmen. Der hierzu verwendete Apparat ist für eine Extraktion von bis zu 50 ccm Harn bestimmt. Zehn derartige

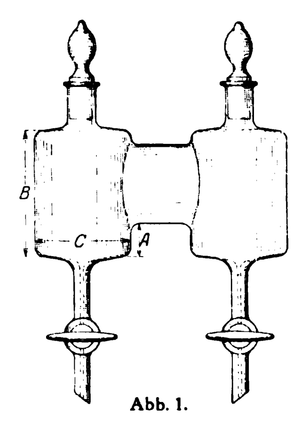


Abb. 1.

[1]) A new method for quantitative extraction of liquids. Skand. Arch. f. Physiol. 84, 61 bis 71, 1926.

Apparate können in der gleichen motorgetriebenen Schaukel angebracht werden.

Bei der Extraktion einer organischen Säure wird der mit Mineralsäure angesäuerte Harn (Dimittenslösung) in den einen Scheidetrichter

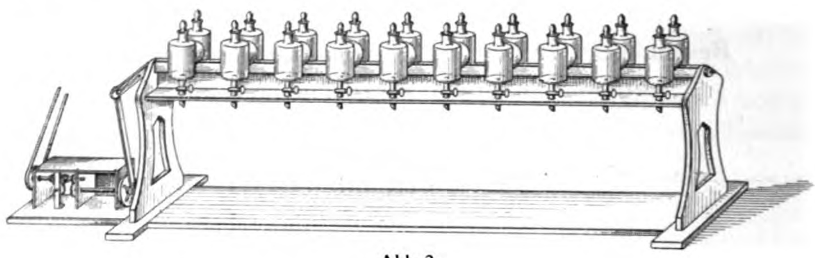


Abb. 2.

und eine verdünnte Alkalilösung (Rezipienslösung) in den anderen gebracht. Über die Lösungen wird eine solche Menge des Extraktionsmittels (350 ccm) geschichtet, daß dasselbe in das Kommunikationsrohr hinaufreicht. Während des Schaukelns erfolgt die Extraktion von der Oberfläche der Dimittenslösung und die Säure wird von der Rezipienslösung als Alkalisalz zurückgehalten.

Diese Extraktionsmethode besitzt folgende Vorteile. Bei konstanter Schaukelgeschwindigkeit, Neigungswinkel und Flüssigkeitsvolumen ist die Extraktionsgeschwindigkeit konstant und kann für jeden Stoff, der Gegenstand einer quantitativen Bestimmung ist, ermittelt werden. Die in der Zeiteinheit extrahierte Menge ist der übrigbleibenden proportional. Die Geschwindigkeitskonstante (k) kann daher nach folgender Formel berechnet werden:

$$\log \frac{a}{a - x} = k t,$$

worin a = der ursprünglichen Menge Säure im Dimittensgefäß und x = der nach der Zeit t in der Rezipienslösung aufgenommenen Menge Säure ist.

Die praktisch verwendbare Extraktionszeit ist die zehnfache Halbierungszeit. Diese letztere wird definiert durch:

$$\text{Halbierungszeit} = \frac{0{,}30103}{k}.$$

Bei der Extraktion wird durch die langsame Bewegung in den allermeisten Fällen jede Spur von Emulsionsbildung vermieden und werden die Extrakte hierdurch besonders rein. Sie können des weiteren durch Ersetzen der Dimittenslösung durch destilliertes Wasser gereinigt werden.

Schließlich ist der Antrieb für die Extraktion sehr billig, indem zehn Extraktionen durch einen $^1/_{16}$-Pferdekraft-Motor getrieben werden können.

Bei der Bestimmung von freier und gebundener Benzoesäure habe ich Toluol als Extraktionsmittel verwendet, in dem die freie Benzoesäure leicht löslich ist, während die gebundene, hauptsächlich Hippursäure, sehr schwer löslich ist. Die Werte, die mit diesem Extraktionsmittel für freie Benzoesäure erhalten werden, sind allerdings etwas zu hoch, was auf einer Mitextraktion von anderen toluollöslichen Säuren (hauptsächlich flüchtigen Fettsäuren) beruht. Mit diesem Fehler dürften indessen die meisten anderen hierfür verwendeten Methoden behaftet sein, und er dürfte keine größere Rolle spielen, da die freie Benzoesäurefraktion, verglichen mit der Fraktion gebundener Benzoesäure, in der Regel sehr unbedeutend ist.

Zur Verdeutlichung der Verwendbarkeit der Methode sei hier festgestellt, daß unter freier Säure jene Menge Säure verstanden wird, die mit Toluol aus unbehandeltem, angesäuertem Harn extrahiert werden kann. Die Totalbenzoesäure ist jene Menge Säure, die aus angesäuertem Harn nach vollständiger Hydrolyse extrahiert werden kann. Die gebundene Benzoesäure (hauptsächlich Hippursäure) ist die Differenz zwischen Totalbenzoesäure und der freien Säure oder jener Menge Säure, die mit Toluol nach dem Extrahieren der freien Benzoesäure und darauf folgender Hydrolyse aus dem Harn extrahiert werden kann. Hinsichtlich der Korrektion dieser Werte auf Grund einer gewissen Löslichkeit der Hippursäure in Toluol wird später berichtet.

Bestimmung der freien Benzoesäure.

40 ccm Harn werden in das Dimittensgefäß gebracht, worauf 5 ccm 5 n Schwefelsäure zugesetzt werden. Sollte der Harn danach gegen Kongopapier keine saure Reaktion aufweisen, so wird weiter Säure zugesetzt, bis dies der Fall ist. In das Rezipiensgefäß bringt man 30 ccm ungefähr 0,065 n Natronlauge, am bequemsten mit einer automatischen Pipette. Darauf werden vorsichtig 325 ccm Toluol zugegeben und dann wird etwa 18 Stunden extrahiert. Die Extraktionszeit wird vermerkt.

Zur Extraktion habe ich *Kahlbaums* Toluol zur Molekulargewichtsbestimmung benutzt, das zur Entfernung saurer Verunreinigungen 6 Stunden am Wasserbad mit Rückflußkühler nach Zusatz von Barythydrat in fester Form gekocht worden war. Zwischen den Extraktionen wird das Toluol über Baryt verwahrt und unmittelbar vor dem Verwenden filtriert.

Nach dem Extrahieren wird die durch die Lauge aufgenommene Säure durch Titration bestimmt. Eine derartige Bestimmung kann indessen aus zwei Gründen nicht direkt durch Titration des Alkaliüberschusses vorgenommen werden. Teils werden vom Toluol ziemlich erhebliche Mengen Kohlensäure extrahiert, die zur Titration entfernt

werden muß. Teils zeigt schon ein „Leerversuch“, daß das Toluol selbst kleine Mengen Säure an die Lauge abgibt.

Zur Vermeidung dieser beiden Fehlerquellen wird bei der Titration auf folgende Weise verfahren. Die Lauge wird in einen 500-ccm-Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas abgelassen. Der Harn wird durch den Hahn des Dimittensgefäßes abgelassen, und den größten Teil des Toluols läßt man denselben Weg nehmen, wobei dasselbe durch Neigen des Apparats vom Rezipiensgefäß fast vollständig dekantiert werden kann. Zur quantitativen Entfernung der Lauge wird dreimal mit ungefähr 10 ccm destilliertem Wasser nachgespült. Nun wird Salzsäure zugesetzt, die ungefähr 22 bis 23 ccm einer n/10 Lösung entspricht (z. B. 30 ccm 0,075 n Salzsäure). Darauf wird am Rückflußkühler 15 Minuten gekocht, der Kolben bei aufgesetztem Kühler abgekühlt, worauf man mit genau gestellter n/10 Lauge titriert. In einem Leerversuch, der in der eben beschriebenen Weise mit 40 ccm destilliertem Wasser und 5 ccm normaler Schwefelsäure anstatt Harn im Dimittensgefäß ausgeführt wird, bestimmt man ein für allemal genau den Säureüberschuß, der beim Zusetzen der Salzsäure und dem darauf folgenden Kochen am Rückfluß entsteht. Dieser Wert wird von der bei der Titration des Harnextrakts verbrauchten Lauge abgezogen; die Differenz bildet demnach das Bestimmungsresultat, das zweckmäßig in Milliäquivalenten ausgedrückt wird. Ein Kubikzentimeter n/10 Lauge entspricht bekanntlich 0,1 Milliäquivalent Säure.

Zur Beleuchtung der Genauigkeit, mit der die Benzoesäure extrahiert werden kann, seien folgende zwei Versuche angeführt, die eine Bestimmung der Extraktionskonstanten (k) bilden.

Im Dimittensgefäß 50 ccm Lösung, enthaltend 0,963 Milliäquivalent Benzoesäure. Schaukelperiode im Mittel 27 Sekunden. Neigungswinkel etwa 18°.

Extraktionszeit Min.	Extrahierte Säure Milliäquiv (x)	Extrahierte Säure Proz.	Extraktionskonstante k
	Apparat VII		
97	0,461	47,9	0,0029
120	0,570	59,2	0,0032
243	0,846	87,9	0,0038
338	0,899	93,4	0,0035
720	0,951	98,8	0,0027
916	0,953	99,0	—
	Apparat X		
120	0,630	65,4	0,0038
243	0,853	88,6	0,0038
338	0,885	91,9	0,0032
410	0,921	95,6	0,0035
916	0,960	99,7	—

Die Mittel für die Konstanten sind 0,0032 und 0,0036, die entsprechenden Halbierungszeiten 94 und 84 Minuten. Vollständige Extraktion wird demnach mit Apparat VII nach 16 Stunden und mit Apparat X nach 14 Stunden erhalten.

Bestimmung der Totalbenzoesäure.

Die Extraktion der Totalbenzoesäure erfolgt in der gleichen Weise wie früher beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß der Harn zuerst der Hydrolyse mit Alkali unterworfen wird. Alkali ist früher zur Spaltung von Hippursäure und anderen von *Folin* verwendet worden. Die Benutzung von Alkali hat vor der von Säure den Vorteil, daß man Verluste von Benzoesäure wegen ihrer Flüchtigkeit vermeidet.

Zu 40 ccm Harn werden in einem 100-ccm-Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas 10 ccm 6 n Natronlauge gegeben und der Kolben bis zum Halse in ein kochendes Wasserbad 7 Stunden oder so lange eingetaucht, bis ungefähr 15 ccm der Lösung übrigbleiben. Nach Ablauf dieser Zeit werden 10 ccm 7 n Schwefelsäure zugesetzt, wobei man sich wie früher davon überzeugt, daß die Lösung Kongopapier blauschwarz färbt. Nach Verdünnung auf ungefähr 40 ccm und Abkühlung wird die Lösung quantitativ in das Dimittensgefäß gebracht, wobei man den Erlenmeyerkolben mit einem kleineren Teil des Toluols, das zur Extraktion verwendet werden soll, nachspült. Man extrahiert mit Lauge und behandelt diese auf die gleiche Weise wie früher beschrieben.

Wenn wenig Harn zur Verfügung steht, kann man die gleiche Quantität sowohl zur Bestimmung der freien wie der gebundenen Benzoesäure verwenden. Hierbei muß man den Harn von der ersten Extraktion quantitativ aufsammeln sowie mit 15 anstatt 10 ccm Lauge versetzen. Die Hydrolyse muß etwas länger fortgesetzt werden, da das Flüssigkeitsvolumen durch das Ausspülen des Dimittensgefäßes und das hinzugefügte größere Laugenvolumen beträchtlich erhöht worden ist.

Reine Lösungen bedürfen zur vollständigen Hydrolyse nach untenstehenden Versuchen ungefähr 5 Stunden. Wegen der Pufferwirkung der Phosphate im Harn wird die Hydroxylionenkonzentration des Harns oft geringer als die der reinen Lösung, weshalb ich es als zweckmäßig erachtet habe, eine bedeutend längere Hydrolysezeit vorzuschreiben.

In jedem der folgenden neun Versuche wurden 40 ccm Lösung genommen, die mit 10 ccm etwa 6 n Lauge versetzt worden sind. Die Hydrolysezeit wurde in den verschiedenen Versuchen variiert, wobei nach der Extraktion folgende Resultate erhalten wurden:

Zeit im Wasserbad Stdn.	Verwendete Menge Hippursäure Milliäquiv.	Wiedergefundene Menge Hippursäure	
		Milliäquiv.	Proz. der verwendeten
1	0,565	0,372	65,8
2	0,565	0,412	72,9
3	0,565	0,490	86,7
4	0,565	0,543	96,1
4	0,635	0,649	102,2
4	0,635	0,596	93,9
5	0,635	0,642	101,1
5	0,635	0,638	100,5
5	0,635	0,643	101,3

Berechnung der Titrationsresultate.

Beim Ausführen der Bestimmungen mit zwei Harnproben werden die Werte erhalten:

der Primärwert für die freie Benzoesäure = B_1 sowie

die Totalbenzoesäure = HB.

Bei der Vornahme der Bestimmungen mit der gleichen Harnprobe werden die Werte erhalten:

der Primärwert für die freie Benzoesäure = B_1 sowie

der Primärwert für die gebundene Benzoesäure = H_1.

Da die Hippursäure in Toluol nicht vollständig unlöslich ist, wird indessen ein geringer Teil dieser Säure zusammen mit der freien Benzoesäure extrahiert. B_1 wird demnach größer als der wirkliche Wert für die freie Benzoesäure (B) und H_1 entsprechend kleiner als der wirkliche Wert für die gebundene Benzoesäure (H).

Da die Extraktionsgeschwindigkeit der Hippursäure mit Toluol bekannt ist, kann dieser Fehler jedoch korrigiert werden. Die Konstante betrug bei den von mir verwendeten Apparaten im Mittel 0,00144, berechnet mit einer Stunde als Zeiteinheit. Der Korrektionsfaktor $\frac{a}{a-x}$ wird berechnet nach

$$kt = \log \frac{a}{a-x}$$

und ist in folgender Tabelle für 10- bis 24stündige Extraktion der freien Benzoesäure berechnet.

Um den wirklichen Wert für die gebundene Benzoesäure zu erhalten, muß also der Primärwert mit dem Korrektionsfaktor multi-

Extraktionszeit Stdn.	$\frac{a}{a-x}$	Extraktionszeit Stdn.	$\frac{a}{a-x}$
10	1,034	18	1,062
11	1,037	19	1,065
12	1,041	20	1,069
13	1,044	21	1,075
14	1,048	22	1,076
15	1,051	23	1,079
16	1,055	24	1,083
17	1,058		

pliziert werden. Die so erhaltene Erhöhung des Wertes für die gebundene Benzoesäure wird vom Primärwert für die freie Benzoesäure abgezogen. Der wirkliche Wert (H) für die gebundene Benzoesäure ist demnach $\frac{a}{a-x} \cdot H_1$ und der wirkliche Wert für die freie Benzoesäure (B) ist $B_1 - (H - H_1)$.

Die Bestimmung der Extraktionsgeschwindigkeit der Hippursäure muß für jeden Apparat besonders erfolgen, da die Extraktionsgeschwindigkeit einigermaßen mit der Weite des Kommunikationsrohres variiert. Es ist aus technischen Gründen schwierig, dieses in allen Apparaten vollkommen gleich zu machen. Die Bestimmung von k für die Hippursäure geschieht auf folgende Weise. *Kahlbaums* Hippursäure wird aus warmem Wasser zweimal umkristallisiert. Nach gelindem Trocknen wird die Säure 2 Stunden mit Toluol geschüttelt. Das Toluol wird abgesaugt und die Kristalle abermals bei Zimmertemperatur trocknen gelassen. 3 g der Säure werden mit 1 Liter kohlensäurefreiem Wasser geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren ungelöster Säure wird die Menge Hippursäure in 40 ccm Lösung genau durch Titration mit n/10 Alkali bestimmt. Darauf werden 40 ccm gegen 30 ccm n/10 des gleichen Alkalis, das zur Titration verwendet worden ist, während ungefähr 120 Stunden extrahiert. Gleichzeitig führt man einen Leerversuch unter ebenso langer Zeit zur Bestimmung der vom Toluol abgegebenen Säure aus; der hierbei erhaltene Wert wird vom Titrationswert beim Hippursäureversuch abgezogen. Die zur Bestimmung verwendete Lauge muß kohlensäurefrei sein, braucht aber nicht genau gestellt zu sein, weil die Bestimmung von k von den absoluten Werten unabhängig ist. Die ursprüngliche Hippursäuremenge ist a, der Titrationswert nach der Extraktion x. Die Konstante wird berechnet aus $kt = \log a - \log (a - x)$, wobei t zweckmäßig in Stunden ausgedrückt wird. Der Korrektionsfaktor wird für jeden Apparat in einer Tabelle für die Zeit von 10 bis 24 Stunden aufgestellt. Er wird erhalten, indem man in der Logarithmustabelle die Antilogarithmen für das Produkt kt aufsucht.

In untenstehender Tabelle werden vier Versuche zur Bestimmung von freier Benzoesäure und Hippursäure in einem Gemisch wiedergegeben. Die Tabelle bezweckt teils die Genauigkeit der Methode, teils den Gang bei der Durchführung der Korrektion zu demonstrieren.

Bei dem Versuch wurden 50 ccm einer Lösung, die *0,436* Milliäquivalente Benzoesäure und *0,497* Milliäquivalente Hippursäure enthielt, extrahiert. Der Totalbenzoesäuregehalt betrug *0,933* Milliäquivalente. Die Extraktionszeit für die freie Benzoesäure war 18 Stunden.

B_1	H_1	H_2	Korr.	B_2
0,486	0,454	0,482	0,028	0,458
0,464	0,470	0,499	0,029	0,435
0,466	0,469	0,498	0,029	0,437
0,456	0,472	0,501	0,029	0,427

In den Versuchen werden also folgende Mengen in Prozenten wiedergefunden:

Benzoesäure	Hippursäure	Totalbenzoesäure
105,0	97,0	100,8
99,8	100,4	100,1
100,2	100,2	100,2
97,9	100,8	99,5

Mit Ausnahme des ersten Versuchs sind demnach die Resultate sehr zufriedenstellend.

Mit dieser Methode kann man die tägliche Ausscheidung von freier Benzoesäure und Hippursäure an kleinen Versuchstieren wie Ratten bequem verfolgen. Folgende Versuche seien angeführt.

Zwei Ratten erhielten folgende Kost in einer Quantität von 15 g Trockensubstanz täglich:

Getrocknetes Blut . . . . 18 Proz.
Kokosfett . . . . 11 „
Reisstärke . . . . 67 „
Getrocknete Hefe . . . . 4 „

Außerdem wurden täglich einige Tropfen Dorschlebertran zugesetzt. Vom dritten bis einschließlich sechsten Versuchstage erhielten die Tiere 0,639 Milliäquivalente Benzoesäure in der Form des Natriumsalzes. Der Harn wurde quantitativ aufgesammelt, und die Bestimmungen beider Fraktionen wurden mit der gesamten Tagesmenge durchgeführt. Die Tabelle gibt abgeschiedene Benzoe- und Hippursäure in Milliäquivalenten an.

Nr. 1		Nr. 2		
Benzoesäure	Hippursäure	Benzoesäure	Hippursäure	
0,047	0,121	0,042	0,122	Vor dem Zusatz von Benzoesäure
0,030	0,242	0,017	0,147	
0,126	0,673	0,082	0,611	Nach dem Zusatz von Benzoesäure
0,109	0,752	0,059	0,718	
0,111	0,740	0,063	0,740	
0,127	0,764	0,058	0,798	

Beim Tier 1 scheinen im Mittel 95 Proz. der verabreichten Benzoesäure, beim Tier 2 ungefähr 88 Proz. wieder ausgeschieden worden zu sein. Der Unterschied zwischen den beiden Tieren ist hauptsächlich in der ausgeschiedenen Menge freier Benzoesäure zu sehen.

Über den Einfluß der Nahrung auf die Hippursäuresynthese beim Menschen.

Von

Erik M. P. Widmark.

(Medizinisch-chemisches Institut, Lund.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1926.)

In einer Serie von Publikationen haben *Abderhalden* und Mitarbeiter den Einfluß der Nahrung auf den Verlauf verschiedener Prozesse im lebenden Organismus studiert. Als Versuchstiere haben sie Kaninchen benutzt, denen teils eine Nahrung verabreicht wurde, die beim Stoffwechsel einen Säureüberschuß ergibt (Hafer), teils solche, die einen Basenüberschuß ergibt. Sie haben einen tiefgehenden Einfluß im Wirksamkeitsgebiet der Hormone und auf von diesen regulierte Vorgänge angegeben. Die Untersuchungen wurden auf die Frage ausgedehnt, ob die Nahrung auch den quantitativen Verlauf der synthetischen Tätigkeit des Organismus beeinflussen kann. *Abderhalden* und *Wertheimer* waren der Ansicht, die Hippursäuresynthese als ein Beispiel für einen derartigen Einfluß der Zusammensetzung der Nahrung aufstellen zu können (1). Sie fanden, daß diese Synthese bei Tieren mit Haferkost in erheblich größerer Ausdehnung erfolgte als bei solchen, die Grünfutter erhielten. Obgleich die Tiere ungefähr die gleiche Menge Benzoesäure im Futter erhielten, schieden die Hafertiere doch erheblich größere Mengen Hippursäure aus. Das gleiche Resultat wurde erhalten, wenn den Tieren Phenylpropionsäure verabreicht wurde (2).

Dieses Beispiel für den Einfluß der Nahrung auf eine Synthese im Tierorganismus fiel indessen weg, seit *Griffith* (3) gezeigt hat, daß das Resultat von *Abderhalden* und seinen Mitarbeitern auf fehlerhaften Bestimmungen beruht hat, indem der alkalische Harn der Grünfuttertiere vor der Extraktion der Hippursäure mit Essigäther nicht genügend angesäuert worden ist. *Abderhalden* hat diesen Irrtum zugegeben (4), macht aber fortwährend geltend, daß die Bildung von *Merkaptursäure*

nach Verabreichung von Brombenzol von der Nahrung in gleicher Richtung beeinflußt wird, wie er früher hinsichtlich der Hippursäure zu finden geglaubt hat.

Die Frage nach dem Einfluß der Nahrung auf die Hippursäuresynthese dürfte hiermit indessen nicht abgeschlossen sein. Im Jahre 1924 zeigte ich zusammen mit *Jensen-Carlen* (5), daß, wenn man beim Menschen die Kohlehydrate aus der Kost ausschließt, verabreichte Benzoesäure hauptsächlich in freier Form abgeschieden wird, während die Hippursäuremenge (oder vorsichtiger ausgedrückt: die Menge Benzoesäure, die durch Hydrolyse des Harns mit Säure gewonnen werden kann) in entsprechendem Grade abnimmt.

Da diese Versuche mit einer verhältnismäßig primitiven Methode ausgeführt worden sind, und da man den Verdacht hegen könnte, daß unsere Analysen mit dem gleichen Fehler behaftet seien wie die von *Abderhalden* und *Wertheimer*, habe ich diese Versuche wiederholt, wobei die Bestimmungen nach einer in dieser Zeitschrift ganz kürzlich von mir publizierten Methode ausgeführt worden sind. Diese Methode ermöglicht eine gleichzeitige Bestimmung von sowohl freier wie gebundener Benzoesäure, und man bekommt demnach durch diese Bestimmungen eine Garantie dafür, daß nicht ein Teil der Benzoesäure sich den Bestimmungen entzieht, oder daß die Veränderungen im Hippursäuregehalt des Harns nur auf einer herabgesetzten sekretorischen Aktivität der Nieren beruhen.

Die Versuchsperson, ein 31jähriger Cand. med., erhielt jeden Tag 1 g Natriumbenzoat. Während der ersten 3 Tage bekam er normale Diät, darauf wurden die Kohlehydrate bei unveränderter Eiweißzufuhr 4 Tage lang ausgeschaltet. Die Versuchsperiode wurde mit 4 Tagen Normaldiät abgeschlossen. Der Harn wurde quantitativ in Gefäßen aufgesammelt, die etwa 5 g Natriumfluorid enthielten. Die Analysen wurden regelmäßig am selben Tage begonnen, da die Harnproben erhalten wurden.

Datum	Totalbenzoesäure Milliäquiv.	Freie Benzoesäure Milliäquiv.	Gebundene Benzoesäure Milliäquiv.	Tagesmenge Harn ccm	$\frac{\text{Freie Säure}}{\text{Totale Säure}}$
12. I.	13,92	2,16	11,76	1200	0,16
13. I.	10,56	1,48	9,07	925	0,14
14. I.	12,22	1,15	11,07	820	0,09
15. I.	13,96	1,95	12,01	1390	0,14
16. I.	13,20	2,51	10,69	1320	0,19
17. I.	10,55	2,31	8,24	1340	0,22
18. I.	11,78	6,95	4,83	965	0,60
19. I.	10,63	1,95	8,68	1000	0,18
20. I.	14,79	2,41	12,38	1060	0,17
21. I.	12,60	1,41	11,19	940	0,11

Die letzte Kolonne der Tabelle zeigt am deutlichsten die Schwankungen im Verhältnis zwischen freier Benzoesäure und der Totalmenge ausgeschiedener Benzoesäure. Man sieht, wie die kohlehydratfreie Diät (15. bis 18. Januar) auch in diesem Versuch eine Erhöhung des Bruches zur Folge hat, was darin resultiert, daß am vierten Tage 60 Proz. der Benzoesäure in freier Form ausgeschieden werden und nur 40 Proz. als Hippursäure oder in gebundener Form. Nach diesem Tage mußte der Versuch abgebrochen werden, da sich der Patient wegen der Acidose unwohl fühlte. Unmittelbar nach dem Einführen der Normaldiät wird die Menge freier Benzoesäure vermindert, und das Verhältnis zwischen freier und gebundener Säure nimmt während aller folgenden Versuchstage ab, um auf den Wert zu sinken, der in der ersten Normalperiode gefunden worden ist.

Es ist in diesem Versuch ausgeschlossen, daß sich die Hippursäure der Bestimmung entzogen hat. Mit dem Harn vom 18. Januar wurden wiederholte Bestimmungen mit übereinstimmendem Resultat ausgeführt und wurde hierbei besonders darauf geachtet, daß der Harn bei der Extraktion der nach Hydrolyse mit Alkali frei gemachten Benzoesäure gegen Kongopapier sauer reagierte. Wie sich aus der zweiten Kolonne der Tabelle ergibt, ist die Summe von freier und gebundener Benzoesäure während des ganzen Versuchs ziemlich gleich. Wenn die Menge freier Benzoesäure zunimmt, nimmt gleichzeitig die der gebundenen in entsprechendem Grade ab. Dies ist ein weiterer Beweis für die Richtigkeit der Bestimmungen.

Während dieser Zeit wurde die Wasserstoffionenkonzentration des Harns gemessen. Auf Grund des Fluornatriumzusatzes ist es wahrscheinlich, daß die für p_H erhaltenen Werte etwas zu hoch sind.

Datum	p_H	
12. I.	—	
13. I.	6,33	
14. I.	5,77	
15. I	6,03	
16. I.	5,55	
17. I.	5,38	1 g Natriumbicarbonat per os
18. I.	6,08	4 g " " "
19. I.	8,12	
20. I.	7,44	
21. I.	7,22	

Im Gegensatz zu den früher erwähnten Versuchen von *Abderhalden* und Mitarbeitern findet man hier die ungenügende Synthese unter dem Einfluß jener Nahrung, die *Acidose* gibt, während die Synthese bei normaler Diät fast vollständig ist. Auch in den Versuchen von *Abder-*

halden dürfte die Fütterung in bezug auf die Kohlehydratzufuhr sehr verschieden gewesen sein, indem die Haferdiät wahrscheinlich bedeutend größere Mengen Kohlehydrate enthalten haben dürfte als die Grünfutterdiät. In welchem Maße man den Variationen in der Kohlehydratmenge in diesen Versuchen einen größeren Einfluß zuschreiben soll als der Veränderung der Alkalireserve, dürfte ohne weitere Versuche schwer zu entscheiden sein.

Gestützt auf diese Versuche bin ich der Ansicht, *daß wir die Hippursäuresynthese als erstes Beispiel für eine im Tierorganismus erfolgende Synthese aufstellen können, die in ihrem quantitativen Verlauf von der Zusammensetzung der Nahrung abhängig ist. Bei Anwesenheit von Kohlehydraten in der Nahrung erfolgt sie leichter als bei Abwesenheit derselben.*

Die Beobachtung ist von bedeutendem theoretischen Interesse. Eine Erklärung derselben kann ich noch nicht geben. Man kann sich jedoch fragen, ob die mangelhafte Verbrennung von Fettsäuren und gewissen Aminosäuren unter Bildung von Acetonkörpern und die mangelhafte Synthese von Hippursäure bei Kohlehydratmangel eine gemeinsame Ursache haben.

Die Hippursäuresynthese bedeutet die Entstehung einer Peptidbindung, also einer Synthese des gleichen Charakters wie jene, von der man glaubt, daß sie die verschiedenen Aminosäuren im Eiweißmolekül verbindet. Die in bezug auf die Hippursäuresynthese gemachte Beobachtung soll deshalb zur Erwägung mahnen, ob nicht auch die Peptidbindung bei der Synthese des Eiweißes bei Abwesenheit von Kohlehydrat erschwert wird.

Wegen der geringen Anzahl Versuchspersonen, die mir zur Verfügung gestanden haben, kann ich nichts darüber sagen, ob die oben beschriebene Erscheinung immer mit der gleichen Regelmäßigkeit auftritt wie bei der hier erwähnten Versuchsperson. Gewisse Beobachtungen deuten auf eine variierende Empfindlichkeit für Kohlehydratmangel, in Übereinstimmung mit dem, was man auch in bezug auf das Auftreten von Acetonkörpern findet. Hunde zeigen geringere Empfindlichkeit als Menschen, und bei Ratten liegen die Veränderungen im Quotienten freie Benzoesäure/totale Benzoesäure fast gleich bei kohlehydratreicher und kohlehydratarmer Diät.

Literatur.

1) *Abderhalden* und *Wertheimer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **206**, 460 bis 466, 1924. — 2) *Dieselben*, ebendaselbst **207**, 215 bis 221, 1925. — 3) *Griffith* Journ. of biol. Chem. **64**, 401 bis 408, 1925. — 4) *Abderhalden* und *Wertheimer*, Arch. f. d. ges. Physiol. **209**, 611 bis 612, 1925. — 5) *Widmark* und *Jensen-Carlen*, C. r. d. séances d. la Soc. de Biol. **90**, 1185, 1924.

Ein neues Kolorimeter für kleine Flüssigkeitsmengen[1] (Mikrokolorimeter).

Von

Hans Kleinmann.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 20. September 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

Für die Bestimmung kleinster Substanzmengen ist es wünschenswert, besonders für physiologisch-chemische Zwecke, mit der absoluten Menge Untersuchungsmaterial weiter als bisher hinuntergehen zu können, ohne grundsätzlich die übliche Analysentechnik zu verlassen oder bebesonderen Schwierigkeiten zu begegnen.

Für die zahlreichen auf kolorimetrischem Prinzip beruhenden Bestimmungsformen wäre diese Forderung erfüllbar, wenn das zur endgültigen kolorimetrischen Messung dienende Flüssigkeitsvolumen unbeschadet der Genauigkeit der Messung wesentlich verkleinert werden könnte. Während die bei der eigentlichen Analysenarbeit verwandten Flüssigkeitsmengen im allgemeinen ohne Erschwerung der Technik verkleinert werden könnten — so lassen sich z. B. mit geeigneten Geräten 0,1 ccm ebensogut abmessen wie 1,0 ccm — begrenzt das zu den bisherigen kolorimetrischen Bestimmungen notwendige Volumen die Substanzmenge nach unten, da die Substanzkonzentrationen, die eine gut kolorimetrierbare Färbung liefern, das Messungsbereich der Methodik bedingen.

Fast alle bekannten Präzisionskolorimeter benötigen Flüssigkeitsvolumina zwischen 20 bis 50 ccm. Die Methodenvorschriften für kolorimetrische Untersuchung fordern daher fast stets 50 ccm Bestimmungsvolumen. Die als Mikrokolorimeter bekannten Instrumente sind aber zum Teil keine Präzisionsinstrumente, zum Teil tragen sie ihren Namen mit Unrecht, da sie zwar ein geringeres Flüssigkeitsvolumen erfordern, zur

[1]) Das Instrument wird von der Firma F. Schmidt und Haensch, Berlin S 42, Prinzessinennstraße 16, hergestellt.

Messung desselben sich aber einer entsprechend geringeren Flüssigkeitsschicht bedienen.

Die Farbtiefe einer Flüssigkeitsschicht wird bedingt durch Konzentration und Schichthöhe. Wird die für die Messung der minimalen Konzentration notwendige Schichthöhe herabgesetzt, so muß zur Erreichung der Meßbarkeit umgekehrt proportional die Konzentration erhöht werden, d. h. die untere Grenze für die absolute noch meßbare Substanzmenge bleibt die gleiche. Hinzu kommt aber, daß bei Messung kleiner Schichthöhen der prozentuale Fehler größer wird, da bei der üblichen Messungform ein bestimmter Einstellfehler schon technisch-mechanisch nicht unterschritten werden kann.

Ein Mikrokolorimeter muß daher das Flüssigkeitsvolumen verkleinern, ohne die Schichthöhe zu vermindern. Dies ist bei Kolorimetern nach dem Dubosqprinzip durch starke Verkleinerung der Radien der Tauchröhren und der zylindrischen Gefäße zur Aufnahme der Flüssigkeit möglich. Hierbei ergeben sich nicht nur mechanische Aufgaben, sondern auch optische. Abgesehen von der fehlerfreien Leitung des Strahlenbündels durch sehr geringe Querschnitte soll im Okular ein Gesichtsfeld erhalten werden, das hinsichtlich seiner Größe den Gesichtsfeldern, wie sie Dubosqapparate bekannter Bauart zeigen, entspricht, da ein genügend großes Gesichtsfeld für ein bequemes und genaues Einstellen unbedingt notwendig ist. Die Meßgenauigkeit eines Mikrokolorimeters muß die gleiche sein wie bei bekannten Präzisionskolorimetern. Die Bedienung des Apparats muß handlich bleiben.

In gemeinsamer Arbeit mit dem wissenschaftlichen Mitarbeiter der Firma F. Schmidt & Haensch, Herrn *Bechstein*, ist es gelungen, ein derartiges Mikrokolorimeter zu bauen.

Das nach dem Dubosqprinzip konstruierte Instrument erfordert zur Messung 1 ccm Flüssigkeit. Es gestattet, die Tauchhöhe meßbar bis zu 60 mm zu variieren, und weist hierbei ein Gesichtsfeld auf, das so groß ist wie bei den üblichen Dubosqpräzisionskolorimetern der gleichen Firma. Der Gesichtsfeldwinkel a beträgt bei dem neuen Mikrokolorimeter ebenso wie bei dem Dubosqkolorimeter für 50 ccm Fassungsvermögen der genannten Firma etwa 4,5°. Die Meßgenauigkeit von etwa 1 Proz. ist die gleiche.

Es ist daher möglich, bei Anwendung des Instruments, mit der Ausgangsmenge an Analysensubstanz um etwa das 20- bis 50fache hinunterzugehen.

II. Beschreibung des Instruments.

Das Instrument ist nach dem Dubosqprinzip gebaut, da hierdurch völlige Gleichheit im Strahlengang der beiden Vergleichssysteme gewährleistet wird. Die optischen und mechanischen Einrichtungen

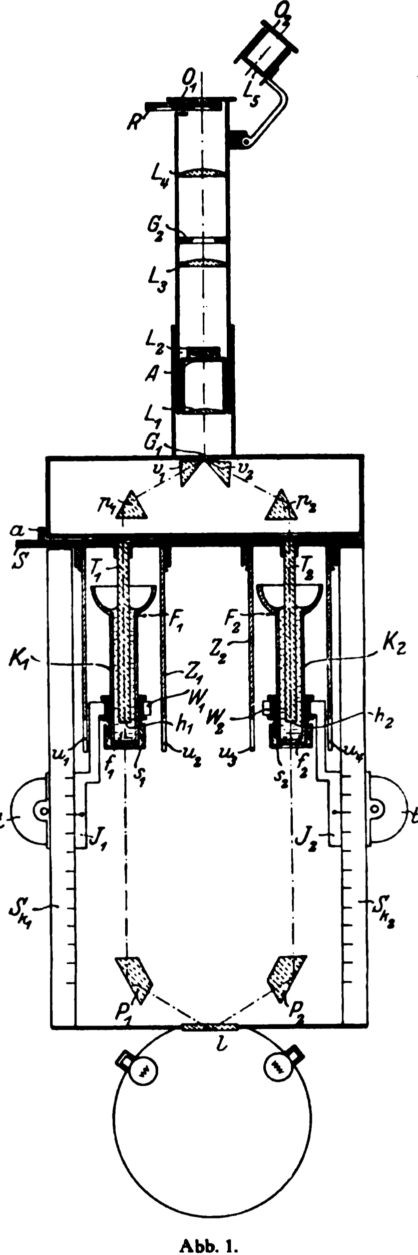


Abb. 1.

der beiden Seiten sind in der Frontalebene vollkommen symmetrisch.

Die optischen Einrichtungen sind so gewählt, daß die Schichtdicke der Flüssigkeit 60 mm betragen kann, wenn nur 1 ccm Flüssigkeit verwendet wird und daß die Helligkeit des Instruments bei genügend großem Gesichtsfeld ein angenehmes Arbeiten erlaubt.

Die Einzelheiten der Konstruktion zeigt Abb. 1.

a) Optische Konstruktion.

Das von einer diffus strahlenden Milchglasplatte l ausgehende Licht (als Lichtquelle soll eine Auer- oder elektrische Glühlampe oder eine Beleuchtungskugel — die sehr empfohlen werden kann und hier gezeichnet ist — verwendet werden) durchläuft für die eine Vergleichsseite „1“ der Reihe nach ein Reflexionsprisma P_1, die in der Dicke zu verändernde Flüssigkeitsschicht f_1, den oben linsenförmig angeschliffenen Tauchstab T_1, das Reflexionsprisma p_1, das die eine Vergleichsseite ergebende Vergleichsprisma v_1, die Gesichtsfeldsblende G_1 und dann die eigentliche Lupe des Kolorimeters mit der Linse L_1 und den die Größe der Austrittspupille bestimmenden Augendeckel A. Für die andere Vergleichsseite „2“ durchläuft das Licht die gleichartigen, mit dem Index 2 bezeichneten Teile, gemeinsam mit „1“ die Lupe mit der Linse L_1 und dem Augendeckel A.

Das hintere, dem Augendeckel A zugewendete Fernrohr mit den Linsen L_2, L_3 und L_4 sowie dem für die Abblendung der Strahlenbündel unwirksamen Augendeckel O_1 dient der Verlängerung der sonst unbequem kurzen Lupe und der Vergrößerung des Gesichtsfeldes. A und h_1 bzw. h_2 sind äquidistante Bildebenen, so daß, bei reziproker Betrachtung des Strahlengangs, unter Vermittlung der Linse L_1 und der Kugelfläche an T ein scharfes Bild der Öffnung des Augendeckels A auf h_1 bzw. h_2 entworfen wird. Die Öffnung am Augendeckel A ist so groß gewählt, daß ihre auf h_1 bzw. h_2 liegenden Bilder kleiner sind als der 3,5 mm betragende Durchmesser der Tauchstäbe T_1 bzw. T_2. Durch diese Maßnahme wird erreicht, daß beide Vergleichsseiten des Gesichtsfeldes von dem gleichen Lichtstrom durchflossen werden, somit im unbeeinflußten Instrument gleich hell erscheinen müssen.

Das von der Lupe $L_1 - A$ erzeugte virtuelle Bild vom Gesichtsfeld G_1 wird unter Vermittlung der Fernrohrlinsen L_2 und L_3 in der Ebene bei G_2 abgebildet und mit dem Fernrohrokular L_4 vom Okulardeckel O_1 aus betrachtet. Gleichzeitig wird in der Öffnung des Okulardeckels O_1 ein Bild der Austrittspupille bei A des Kolorimeters erzeugt, welches kleiner als die Öffnung O_1 ist. Die eigentliche Austrittspupille des Kolorimeters wird somit in die Pupille des betrachtenden Auges projiziert.

Die Orte h_1 bzw. h_2 werden demzufolge in der Öffnung O_1 abgebildet. Mit der vorschlagbaren Lupe L_5, welche auf O_1 scharf einzustellen ist, kann erkannt werden, ob auf den Flächen h_1 bzw. h_2 Schmutz oder Luftblasen haften. Zweckmäßig wird hierbei jeweils das Licht einer Vergleichsseite mittels eines Stückchens dunklen Papiers usw. — in den Strahlengang zwischen P und S eingeführt — abgedeckt.

Mittels der drehbaren Revolverscheibe R können Farbfilter, und zwar Gelb, Rot, Grün und Blau vor die Öffnung O_1 eingeschaltet werden.

b) Mechanische Konstruktion.

Das Äußere eines von mir benutzten Modellapparats ist in Abb. 2 gegeben.

Vor den das Instrument tragenden Stativfuß ist die Beleuchtungskugel der Firma F. Schmidt und Haensch leicht abschraubbar eingehängt. Die innen geweißte Kugel trägt zwei kleine Glühbirnen, die mit 4 Volt (zwei Akkumulatoren) gespeist werden. Sie gewährt eine gleichmäßige, feststehende, helle Beleuchtung, ohne den Beobachter durch Nebenlicht zu stören.

Der Stativfuß trägt die Führungsschienen S_{k_1} und S_{k_2} für die Verschiebung der Kannen K_1 und K_2. Die Schienen tragen die Triebverstellung t, die mit einer Noniuseinteilung von $^1/_{10}$ mm versehen ist,

und sind auf der dem Beobachter zugewandten Seite mit einer Millimeterteilung versehen. Die jeweils wirksame Schichtdicke wird an den Indizes J_1 und J_2 abgelesen. Die am Trieb befestigten Metallfassungen W_1 und W_2 sind schließbar und umfassen Metallringe, welche die Kannen K_1 und K_2 fest umschließen. Die Kannen können aus W_1 und W_2 herausgezogen werden. Die Tauchkannen fassen, bis zur Füllmarke F_1, F_2 gefüllt, 1,0 ccm Flüssigkeit. Ihr Volumen — bis zum

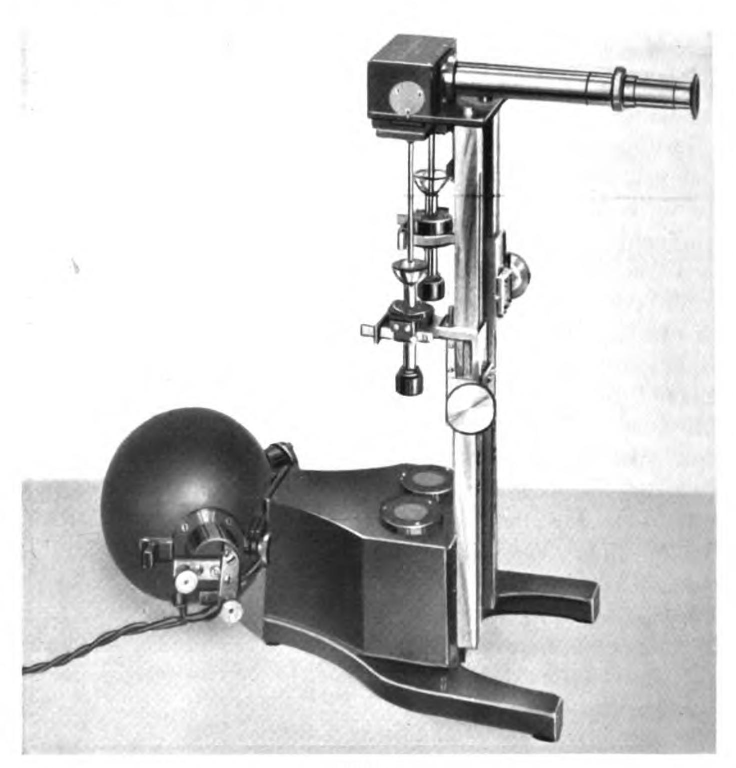


Abb. 2.

Rande gefüllt — beträgt etwa 3 ccm. Die Schichthöhe beträgt dann etwa 70 mm. Die Kannen besitzen an ihrem Fassungsring einen Anschlag, um ihre Stellung, wenn sie in W eingesetzt sind, genau zu fixieren. Dies ist notwendig, da das System „1" gegen „2" in der Frontalebene um einen Millimeter verschoben ist zur Erzielung einer scharfen Trennungslinie der Gesichtsfeldhälften. Hierdurch ist die frontale Stellung von 1 und 2 nicht gleich, wodurch wieder eine Fixierung der Kannenstellung notwendig wird. Die Kannen sind an ihrem unteren Ende durch Deckglas, Gummi- oder Lederring und Schraubkappe verschlossen.

Die Kannen und mit ihnen die Tauchstäbe T_1 und T_2 werden von einem Glasschutzzylinder Z_1 bzw. Z_2 umgeben, der abschraubbar am Kopfe des Stativs befestigt ist. Der Schutzzylinder überragt $T_{1,2}$ und reicht bei völlig hochgeschraubter Kanne bis zur Bodenfläche der Kanne hinab. Der Schutzzylinder trägt an seinem unteren offenen Ende seitlich zwei Ausschnitte u_1 und u_2 bzw. u_3 und u_4, die ein wenig über die Begrenzungsfläche des unteren Endes des Tauchstabes $T_{1,2}$ hinaufreichen.

Der Schutzzylinder schützt die leicht zerbrechlichen Tauchstäbe $T_{1,2}$ vor unvorsichtiger Berührung, die seitlichen Ausschnitte gestatten hierbei doch ein vorsichtiges Reinigen der unteren Tauchstabfläche.

Bei völligem Hinaufschrauben der Kannen würden die Tauchstabenden auf den Kannenboden stoßen, wodurch die Tauchstäbe beschädigt werden könnten. Der Kannentrieb stößt daher bei völligem Hinaufschrauben an einen Anschlag, der bedingt, daß Tauchstabfläche und Kannenboden sich nicht berühren. Der Abstand wird bei allen Instrumenten gleich gemacht und beträgt $^1/_{10}$ mm.

Die Tauchstäbe T_1 und T_2 sind mitsamt ihren Schutzhüllen Z_1 und Z_2 am Stativkopf derart befestigt, daß sie von einer Platte S getragen werden, die mit den an ihr befestigten Teilen aus dem Stativ herausgezogen werden kann. Hierdurch ist eine leichte Reinigung von T_1 und T_2 ermöglicht, da Z_1 und Z_2 gleichzeitig als Spülgefäße dienen. Bei Wiedereinführung von S gewährleistet der Anschlag a die richtige Stellung der Tauchstäbe.

III. Handhabung des Instruments.

Die Handhabung des Instruments ist einfach, doch erfordert sie völlig genaue Befolgung der hier gegebenen Vorschriften.

Völlige Sauberkeit des Arbeitens ist Voraussetzung für einwandfreie Messungen. Verunreinigungen, Fasern, Schmutzpartikelchen, die eventuell bei Kolorimetern mit 50 ccm Fassungsvermögen nicht stören, geben deutlich Störungen bei dem geringen Querschnitt der hier verwandten Tauchstäbe bzw. Lichtbündel. Alle anzuwendenden Lösungen müssen daher faserfrei filtriert sein. Dies gelingt leicht bei Anwendung quantitativer Filter (Schwarzband genügt) S. & S. Andere Filtrierpapierarten geben Fasern ab.

Größte Vorsicht muß hinsichtlich der Tauchstäbe T und T_2 herrschen. Dieselben sind spröde und leicht zerbrechlich und ihr Ersatz kostspielig. Die Schutzzylinder Z_1 und Z_2 sollen nur, wenn unbedingt notwendig, entfernt werden. Es empfiehlt sich, die Tauchstäbe überhaupt nicht mit den Fingern anzufassen, was sich vollkommen erübrigt.

Die Messungen sollen zweckmäßig im Dunkelzimmer geschehen. Zunächst wird beim Aufbau der Apparatur die Beleuchtungskugel am Stativ eingehängt und mit den dazu vorhandenen Schrauben befestigt. Die Kontakte der Beleuchtungskugel werden mit zwei hintereinandergeschalteten

Akkumulatoren verbunden. Es empfiehlt sich, in einen Zuleitungsdraht einen Stromschlüssel einzuschalten.

Nunmehr wird die Platte *S* mit den an ihr hängenden Tauchstäben und Schutzzylindern in das Stativ eingesetzt. Es muß darauf geachtet werden, daß die Platte fest bis zum Anschlag eingesetzt wird, damit die Tauchstäbe genau auf die ihnen zukommenden Stellen geraten. Vor dem Einsetzen werden die Stäbe gereinigt. Diese Reinigung geschieht auch nach Schluß jeder Messungsserie. Hierbei werden die Schutzzylinder, die in ihren Fassungen auf der Platte *S* eingeschraubt sind, als Spülgefäße benutzt. Die Zylinder werden mit aqua dest. gefüllt, wodurch *T* gewaschen wird, und schließlich werden sie durch Füllen mit reinem Alkohol getrocknet. Während des Arbeitens selbst werden die Tauchstäbe am besten dadurch gereinigt, daß die mit reinem Wasser gefüllten Kannen hochgeschraubt werden. Die Tauchstäbe können entweder an der Luft trocknen, oder werden durch Eintauchen in mit Alkohol gefüllte Kannen getrocknet. Am zweckmäßigsten ist es, wie weiter unten beschrieben, daß sie während der Arbeit überhaupt nicht getrocknet, sondern mit der zu untersuchenden Lösung abgespült werden.

Sind die gereinigten Tauchstäbe in die Apparatur gefügt, so werden die Kannen gereinigt. Dies gelingt leicht, da die Bodenplatte durch Lösung der Fassung s_1 und s_2 abgenommen werden kann. Die Kannen werden ebenfalls mit aqua dest. und Alkohol gereinigt. Während der Arbeit sollen die Kannen nicht getrocknet werden. Es ist zweckmäßiger, auch sie durch Vorspülen mit den einzufüllenden Lösungen zu reinigen.

Auf keinen Fall sollen Tauchstäbe oder Kannen mit Tüchern oder dergleichen in Berührung kommen, da diese nur Fasern abgeben, die schlecht zu entfernen sind. Fasern lassen sich am leichtesten nicht durch Wischen entfernen, sondern dadurch, daß man die völlig trocknen Glasteile mit einem Gebläseball oder dergleichen abbläst.

Beim Zusammensetzen der Kannen ist darauf zu achten, daß der Gummiring, der die Bodenplatte dichtet, sich nicht verschiebt und in das Gesichtsfeld gerät.

Nach dem Reinigen werden die Kannen mit den zu vergleichenden Lösungen gefüllt.

Hierzu zieht man sich ein Glasrohr derart aus, daß man ein kapillares bzw. verjüngtes Stück von der Länge der Tauchkanne erhält. Es ist ratsam, sich beim Arbeiten mit dem Mikrokolorimeter stets mehrere solcher Kapillaren vorrätig zu halten. Der nicht ausgezogene Glasteil soll 5 bis 10 cm lang bleiben.

In diese Füllröhrchen saugt man, pipettenartig, die einzufüllende Flüssigkeit hoch und füllt sie derartig in die Kannen, daß man mit der Kapillaren bis auf den Kannenboden hinabtaucht und dann erst die Flüssigkeit einfließen läßt. Hierdurch wird vermieden, daß sich Luftblasen, die schwer ohne Ausgießen der Flüssigkeit entfernbar sind, in dem Kannenzylinder festsetzen. Man füllt bis zur Füllmarke oder noch etwas mehr Flüssigkeit in den Kannenkelch, wozu man etwa 1,3 ccm gebraucht. In die andere Kanne füllt man die Vergleichslösung. Es ist zur Erhöhung der Messungsgenauigkeit zu empfehlen, die Vergleichslösung der Untersuchungslösung möglichst anzupassen, jedenfalls nicht über ein Konzentrationsverhältnis 1 : 2 unnötig hinauszugehen.

Sind die Kannen vor der Füllung nicht trocken, so füllt man sie einmal mit der zu untersuchenden Lösung, schüttelt die Lösung durch kräftiges

Schlagen mit der Kanne aus und füllt sie dann endgültig aufs neue. Die Kannen werden dann in das Stativteil *w* eingesetzt.

Es muß sorgfältig darauf geachtet werden, daß der aufklappbare Ring $W_{(1 \text{ u. } 2)}$ durch die Öffnung des Seitenansatzstückes, der sich an dem Fassungsring der Tauchkanne befindet, hindurchgesteckt wird. Der Ansatzteil wird dann soweit nach hinten — zum Untersucher — gedreht, bis er an seinen Anschlag am Stativ anstößt. Nur dann sitzt die Kanne richtig zentrisch. Wird auf die richtige Kanneneinführung, die viel schneller geschieht als sie beschrieben wird, nicht geachtet, so sitzt die Kanne nicht in ihrer richtigen Stellung und zerbricht beim Hinaufschrauben den Tauchstab.

Um bei fortlaufenden Messungen ein ständiges Reinigen der Kannen zu ersparen, empfiehlt es sich, sich mehrere Kannen, die einzeln beziehbar sind, anzuschaffen. Die Kannen müssen in jedes Instrument einjustiert werden.

Sind bei fortlaufender Messung die Tauchstäbe noch von der Untersuchung der vorangehenden Lösung naß, so werden sie dadurch gereinigt, daß man sie in die Kannen, die zum Vorspülen mit der Untersuchungslösung gefüllt sind, eintauchen läßt.

Nunmehr kann die eigentliche Messung vor sich gehen. Sie beginnt damit, daß man die Tauchstäbe in die Kannen durch Emporschrauben der letzteren eintauchen läßt. Hierbei muß man langsam eintauchen und darauf achten, daß sich kein auch noch so geringes Luftbläschen unter den Tauchstab setzt. Geschieht dies, so muß man austauchen und das Eintauchen nochmals wiederholen. Mitunter sitzen Luftbläschen so hartnäckig an der unteren Tauchstabfläche, daß wiederholtes Ein- und Austauchen sie nicht entfernt. Man muß dann die untere Tauchstabfläche am besten mit einem weichen Lederstücken abtupfen. Man taucht die Kanne völlig aus, dreht einen Lederzipfel spiralig zusammen und tupft, durch den Ausschnitt des Schutzzylinders hindurch die Bodenfläche ab. Fast stets läßt sich dann sofort der Tauchstab luftblasenfrei eintauchen.

Man rührt durch schnelles Auf- und Niederschrauben der Kannen die Flüssigkeit gut durch und schraubt dann die Kannen so weit als möglich hoch. Jetzt schlägt man die Vorschlagslinse L_5 vor das Okular und stellt sich durch vorsichtiges Drehen derselben den Augendeckel scharf ein. Man sieht den Augendeckel als kleinen hell beleuchteten Kreis im Okular. Nunmehr bedeckt man mit einem Stückchen Karton — man kann das Bedecken auch leicht mit der Hand ausführen — je ein Fenster, das über dem Beleuchtungsprisma P_1 und P_2 liegt und schaltet so die Beleuchtung einer Kanne aus. Man betrachtet daher dann nur die von einem Tauchstab beleuchtete Austrittspupille bzw., da diese und das untere Ende des Tauchstabes äquidistante Bildebenen sind, das untere Ende des einen beleuchteten Tauchstabes. Man sieht Fasern oder Verunreinigungen sofort und erkennt auch Luftblasen. Dieselben zeigen sich oft dadurch, daß das Bild der Augenpupille nicht kreisrund, sondern ausgezackt erscheint. Sodann verdeckt man das andere Fenster und beobachtet die Bodenfläche des zweiten Tauchstabes.

Diese Untersuchung ist in wenigen Augenblicken ausgeführt. Es ist unbedingt notwendig, sie vor jeder Messung vorzunehmen. Nur durch sie sind störende kleine Luftbläschen zu erkennen, und nur dann ist die Messung einwandfrei. Luftblasen am Tauchstab sind wie beschrieben zu entfernen. Luftblasen in der Kanne können nur durch neue Füllung der Kanne beseitigt werden.

Zeigt die Beobachtung des Augendeckels einwandfreien Strahlengang, so stellt man die Kanne einer Seite auf eine geeignete Höhe. Gewöhnlich wird man sie auf halbe Höhe also etwa 30 mm stellen. Bei völligem Heraufschrauben zeigt der Index nicht genau 0. Dies liegt daran, daß der Tauchstab nicht auf den Boden der Kanne aufstößt, sondern vorher durch einen Anschlag die Kanne aufgehalten wird. Die Einstellung der Skala geschieht nun beim Justieren der Instrumente in der Fabrik ohne Anschlag derart, daß bei völligem Eintauchen bis zur Kannenbodenfläche der Index 0 zeigt. Die an der Skala vom Untersucher beim Messen abgemessene Tauchhöhe in Millimetern ist also die richtige. Jetzt lasse man das Auge eine Zeitlang bei völliger Dunkelheit adaptieren, stelle sich die Trennungslinie der beiden Gesichtsfeldhälften nach Fortklappen der Vorschaltlupe mittels des Okularfernrohres scharf ein und stelle ohne Vorschalten eines Farbfilters durch *R* auf gleiche Helligkeit beider Gesichtsfeldhälften ein. Es ist sehr zu empfehlen, mehrere, etwa zehn Einstellungen zu machen und den Durchschnittswert zu nehmen. Lassen sich nicht genaue Einstellungen ausführen, so schalte man durch Drehen von *R* Farbfilter ein, die oft die Messung sehr erleichtern. Das Einstellen soll pendelnd um die „Gleichgewichtslage", etwa wie die Handhabung der Mikrometerschraube beim Mikroskop erfolgen. Bei dem beschriebenen Instrument erscheinen die Gesichtsfeldhälften in bezug auf die Tauchgefäße gekreuzt, d. h. die linke Gesichtsfeldhälfte entspricht dem rechten Tauchgefäß und umgekehrt.

Die durch die Ablesung sich ergebenden Tauchhöhen verhalten sich umgekehrt proportional den Konzentrationen, wie bei jedem anderen Tauchkolorimeter.

IV. Prüfung des Instruments.

Für die Prüfung von Kolorimetern fand ich am geeignetsten Verdünnungen von „Pelikan"-Ausziehtuschen (Günther Wagner, Hannover und Wien). Verwendet man zu kolorimetrischen Messungen beliebige Farbstoffe, wie Anilinfarben usw., so findet man oft völlige Unproportionalität zwischen Farbtiefe und Schichthöhe, da eine große Zahl von Farbstoffen nicht dem *Beer*schen Gesetz folgen.

Dagegen haben sich die angegebenen Tuschen, und zwar: für Rot „Zinnober", für Blau „Ultramarin" und für Grün „Grün hell" sehr gut bewährt. Eine geeignete Konzentration für Messungen gibt etwa eine wässerige 0,1 Vol.-proz. Tuscheverdünnung. Die Verdünnungen lassen sich faserfrei filtrieren. Sie halten sich einige Stunden, später verändert sich die Färbung, und die Lösung wird unbrauchbar.

Die Eignung einer Färbung für die Kolorimetrie wächst im allgemeinen vom Gelb zum Blau im spektralen Sinne. Gelbe oder bräunliche Lösungen, die schwer zu kolorimetrieren sind, lassen sich oft leichter beim Vorschalten geeigneter Farbfilter, meist der Komplementärfarben messen. Die Konzentration einer zu kolorimetrierenden Lösung muß in bestimmten Grenzen liegen. Zu hohe Konzentration macht eine Messung ebenso unmöglich, wie zu niedrigere. Die Lösungs oll in der zu untersuchenden Schichtdicke das Licht des Spektralteils ihrer maximalen Absorption nicht völlig auslöschen, sondern noch etwas von demselben durchgehen lassen. Die geeignete Konzentration läßt sich durch Prüfung einiger Verdünnungen mit einem Spektroskop — es genügt ein kleines Taschenspektroskop — leicht ermitteln.

Mit derartigen Farblösungen ist die Genauigkeit der Messungen des Mikrokolorimeters eingehend geprüft worden.

Es wurden Verdünnungen der Tuschen derart untersucht, daß gleiche Lösungen bei verschiedenen, variierten Schichthöhen (zwischen 9,2 bis 59,2 mm) eingestellt wurden. Dann wurden dieselben Lösungen bei Vertauschung der beiden Kannen gemessen, um die Symmetrie des Instruments zu prüfen. Und schließlich wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse gemessen. Es wurden rote, grüne und blaue Farblösungen untersucht. Einen Auszug aus den Resultaten geben die Tabellen im Anhang. Sie zeigen, daß der Messungsfehler von Ablesungen bei Vergleich gleicher Konzentrationen, die aus dem Durchschnitt von zehn Ablesungen ermittelt wurden, 0,5 Proz. nicht überschreitet. Bei Messungen von Konzentrationen im Verhältnis 1 : 2 betrug der durchschnittliche Fehler 1,1 Proz. Dieses Ergebnis erfolgte bei Übung des Untersuchers. Es wurden jedoch Prüfungen auch von anderen, nicht besonders geübten Beobachtern ausgeführt, die zeigten, daß ein Fehler von etwa 1 bis 1,5 Proz. bei den Messungen mit dem Mikrokolorimeter nicht überschritten zu werden braucht.

V. Anhang.

Tabelle I.

Kolorimeter 0-Punkt : 139,2	Schichthöhe, mm :	59,2	49,2	39,2	29,2	19,2	9,2
	Einstellung links	80	90	100	110	120	130
A. Pelikantusche (*Günther* und *Wagner*) „Zinnober" etwa 0,1 Proz.	Durchschnitt von 10 Ablesungen rechts	80,16	89,99	100,04	109,95	120,00	130,05
	Proz. Fehler	0,3	0	0	0	0	0
	Durchschnitt von 10 Ablesungen nach Umtausch der Kannen	79,67	89,69	100,12	109,85	119,93	130,11
	Proz. Fehler	0,6	0,6	0,3	0,5	0,4	1,2
B. Pelikantusche „Grünhell" etwa 0,1 Proz. Grün	Durchschnitt von 10 Ablesungen rechts	79,83	89,95	99,78	109,75	119,67	130,04
	Proz. Fehler	0,3	0,2	0,6	0,9	1,7	0,4
	Durchschnitt von 10 Ablesungen nach Umtausch der Kannen	80,10	89,82	100,25	110,07	119,94	130,09
	Proz. Fehler	0,2	0,4	0,6	0,2	0,3	0,1
C. Pelikantusche „Ultramarin" etwa 0,1 Proz. Blau	Durchschnitt von 10 Ablesungen rechts	80,15	90,05	100,16	110,07	120,08	130,06
	Proz. Fehler	0,3	0,1	0,4	0,2	0,4	0,7
	Durchschnitt von 10 Ablesungen nach Umtausch der Kannen	79,80	89,82	100,07	109,77	119,86	129,91
	Proz. Fehler	0,3	0,4	0,2	0,8	0,7	1,0

Gesamtfehlerdurchschnitt 0,4 Proz.

Tabelle II.

Messungen der Konzentrationsverhältnisse 1 : 2. Kolorimeter-0-Punkt 139,2.

Farbe	Blau Pelikantusche „Ultramarin"			Grün Pelikantusche „grün hell"			Rot Pelikantusche „Zinnober"		
Eingestellt *links*	110	Kannen vertauscht	80	110	Kannen vertauscht	80	110	Kannen vertauscht	80
Durchschnitt von 10 Ablesungen *rechts*	80,45		110,30	80,45		109,40	80,33		110,07
Verhältnis der gemessenen Höhen	58,75 / 29,20		28,90 / 59,20	58,75 / 29,20		29,80 / 59,20	58,87 / 29,20		29,13 / 59,20
Proz. Fehler	0,6		2,4	0,6		0,7	0,8		1,6

Durchschnittlicher Fehler 1,1 Proz.

Mikrokolorimetrische Stickstoffbestimmung. Gesamt- und Rest-N-Bestimmung in Bluttropfen.

Von

Hans Kleinmann.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 20. September 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I.

Die üblichen, meist auf kolorimetrischem Prinzip beruhenden Mikromethoden in der Biochemie fassen im allgemeinen Substanzmengen bis zu 0,1 mg. Es war jedoch wünschenswert, Methoden zu besitzen, die bei Beibehaltung der üblichen analytischen Arbeitstechnik die zu analysierenden Substanzmengen um eine Zehnerpotenz und mehr hinuntersetzten.

Solche Methoden können dadurch gegeben werden, daß die Empfindlichkeit bestimmter Trübungsreaktionen und ihre nephelometrische Messung vereint werden mit kolorimetrischen Methoden, die für kleinere Volumina, als bisher üblich, umgestaltet worden sind, und deren kolorimetrische Bestimmung dann mit dem 1 ccm Volumen erfordernden *Kleinmann*schen Mikrokolorimeter erfolgt.

Diese Methodik gestattet, bei der Bestimmung der in der Blutanalyse üblichen Substanzen, mit wenigen Tropfen Blut oder Körperflüssigkeit auszukommen.

Da entsprechende nephelometrische Methoden schon seit einer Reihe von Jahren vom Verfasser veröffentlicht worden sind, so sollen sie in diesem Zusammenhang in folgenden Arbeiten nur in kurzem Auszug mit den Angaben für die Technik der Blutanalyse, die für den speziellen Zweck noch notwendig sein sollten, gegeben werden.

In vorliegender Arbeit wird die an die bisherige kolorimetrische Bestimmung des Stickstoffs sich anschließende mikrokolorimetrische N-Bestimmungsmethode gegeben werden.

Sie gestattet, N-Mengen bis zu 5 μg[1]) schnell und mit wenigen Prozent Fehler (1 bis 2 Proz., für Mengen bis zu 10 μg hinunter) zu bestimmen. Es ist daher möglich, für die Gesamt-N-Bestimmung im Blute mit 0,002 ccm Blut und für die Rest-N-Bestimmung mit 0,1 ccm (wenn mit Parallelen gearbeitet werden soll mit 0,2 ccm) auszukommen, der leicht aus wenigen Bluttropfen zu gewinnen ist.

II.

Die mikrometrische N-Bestimmung bedient sich der bekannten *Kjeldahl*schen Veraschung, der Wasserdampfdestillation des NH_3, der Nesslerisation und schließlich der mikrokolorimetrischen Messung.

Trotzdem jede einzelne Analysenstufe an sich bekannt ist, bedurfte sie einer genauen Bearbeitung bzw. Umarbeitung, um sie für die mikrokolorimetrische Analyse geeignet zu machen.

Es war zu bearbeiten:

1. *Abmessung des Untersuchungsmaterials*, die nicht, wie bei der *Bang*schen Methodik, durch Abwägen von mit Lösungen getränkten Filtrierpapierplättchen, sondern durch direkte Volumenmessung vorgenommen wird, und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials, wie z. B. Enteiweißung für Rest-N-Bestimmungen.

2. *Apparatur zur Veraschung des Untersuchungsmaterials und zur Wasserdampfdestillation des* NH_3. Bei manchen Vorschriften zur Mikro-N-Bestimmung (z. B. bei der „minimetrischen Methode der Blutuntersuchung" nach *Mandel* und *Steudel*) wird eine direkte Nesslerisation des veraschten Materials vorgenommen. Hiervon wurde abgesehen, da ein hoher Salzgehalt der zur Nesslerisation vorliegenden Lösung — wie ein solcher durch Neutralisation der nach *Kjeldahl* veraschten Substanzlösung bedingt wird — sehr leicht zu Trübungen beim Nesslerisieren führt. Da peinliche Klarheit der Lösungen Vorbedingung für die mikrokolorimetrische Untersuchung ist, wurde prinzipiell die — sehr rasch auszuführende — Wasserdampfdestillation des NH_3 für ein exaktes Kolorimetrieren für notwendig erachtet.

Es wurde eine für die Größenverhältnisse der mikrokolorimetrischen Analyse geeignete Apparatur gegeben, mittels der das gebildete NH_3 mit einem Volumen von 2 bis 3 ccm Wasser hinüberdestilliert wird, so daß das endgültige, für die kolorimetrische Untersuchung vorliegende Flüssigkeitsvolumen 5 ccm beträgt.

Dieses Volumen gestattet einerseits noch ein bequemes Arbeiten bei der Destillation und der Volumenabmessung, andererseits ermöglicht es ein genügendes Vorspülen der Kolorimetergefäße bzw. ein mehrmaliges Füllen derselben, da hierzu ja nur 1 ccm Volumen notwendig ist. Eine den Größenverhältnissen entsprechende Apparatur zur Veraschung wurde angegeben.

---

[1]) 1 μg = 0,001 mg.

3. *Vorschriften zur Reinigung der für die Analyse notwendigen Reagenzien.* Es zeigte sich, daß bei der geringen Größe der zu bestimmenden N-Mengen der Blindwert auch der reinsten handelsüblichen Reagenzien — zumal wenn dieselben eine Zeitlang im Laboratorium gebraucht worden waren —, wie z. B. konzentrierte H_2SO_4, Kjeldahllauge, aqua dest. usw. sehr störend hervortrat und mitunter die zu bestimmende N-Menge nicht unerheblich überschritt. Es mußten daher Methoden gegeben werden, alle benötigten Reagenzien zu reinigen. Es gelang auch, solche Methoden auszuarbeiten, die die Reinigung verschiedener Materialien ohne allzu große Mühe gestatteten. Um aber den Untersucher, der mit der Methodik arbeiten will, nicht mit der Materialreinigung zu belasten, hat die Firma C. A. F. Kahlbaum es übernommen, reinste Reagenzien für die mikrokolorimetrische Analyse in den Handel zu bringen, die in dem für die Analyse notwendigen Volumen in Ampullen eingeschmolzen sind, so daß eine Verunreinigung durch die Laboratoriumsluft nicht in Frage kommen kann.

Da aber mancher Untersucher es vielleicht vorzieht, sich die Reagenzien selbst zu reinigen, und da manche Lösungen — wie Vorlagesäure — selbst bereitet werden sollen, da ihre Herstellung mühelos ist, wurden besondere Sicherheitsflaschen zur ammoniaksicheren Aufbewahrung dieser Lösungen angegeben.

4. *Herstellung eines geeigneten Nesslerreagenses.* Da zur Herstellung brauchbaren Nesslerreagenses sehr mannigfache Vorschriften gegeben sind, besteht eine gewisse Unsicherheit in der Wirkung dieses Reagenses.

Außerdem sind manche Vorschriften, wie z. B. die des bekannten Nesslerreagenses nach *Folin*, umständlich und zeitraubend.

Sowohl das *Folin*sche Reagens als auch andere zeigen bei ihrer Anwendung oft Trübungen der nesslerisierten Lösungen. Diese lassen sich mit Sicherheit auch nicht vermeiden, wenn man nach der Angabe *Folins* völlig carbonatfreie Laugen verwendet.

Erhält man aber klare Lösungen bei der Nesslerisation, so stimmt oftmals nicht das proportionale Verhalten der Farbtiefe zur Schichthöhe bei Variation der Konzentration.

Aus früheren Arbeiten war mir bekannt, daß das nach der einfachen *Autenrieth*schen Vorschrift bereitete Nessler klare Lösungen liefert. Dies bestätigte sich bei erneuter Überprüfung. Es zeigte sich aber, daß die mit *Autenrieth*schem Reagens versetzten Lösungen nach kurzer Zeit einen ganz feinen, staubförmigen roten Niederschlag (Mercurijodid?) aufwiesen, der bei Anwendung der üblichen Kolorimeter kaum aufgefallen wäre, die mikrokolorimetrische Messung aber vereitelte. Es mußte daher die Zusammensetzung des Nesslerreagenses durch Variation der Alkalität und des Kaliumjodidgehalts systematisch variiert werden, bis es gelang, ein völlig zuverlässiges und schnell zu bereitendes Nesslerreagens zu ermitteln, das stets klare nesslerisierte Lösungen liefert, keinerlei Ausfällungen hervorruft und volle Proportionalität zwischen Farbtiefe und Konzentration — bzw. richtiger Schichthöhe — aufweist.

5. *Die Prüfung der Methodik an Lösungen bekannten N-Gehalts und Feststellung ihrer Grenzen und ihres Fehlerbereichs. Die Übertragung der Methodik auf die Blutanalyse bzw. die Rest-N-Bestimmung und Vergleich der mikrokolorimetrischen Rest-N-Bestimmung mit einer Makrotitrationsmethodik.*

III. Apparaturen zur mikrokolorimetrischen N-Bestimmung[1]).

1. *Meßgefäße.* Zur Aufnahme von Untersuchungslösungen bzw. von Blut dienen Fläschchen von 1 ccm Inhalt. Dieselben tragen keine Halsverjüngung, sondern sind gleichmäßig zylindrisch, um ein Hineinfallenlassen von Blutstropfen zu erleichtern. Sie sind durch eingeschliffenen Stopfen schließbar, so daß ein Transportieren des Materials leicht ist. Da für Parallelbestimmungen des Rest-N 0,2 ccm Blut notwendig und ein geringer Überschuß beim Pipettieren angenehm ist, so enthalten sie eine Marke bei 0,25 ccm, nach der sich der die Blutstropfen abnehmende Untersucher ungefähr richten kann. Für eine Bestimmung genügt 0,1 ccm Blut.

Zur Abmessung der Blutmenge dienen 0,1 und 0,2 ccm fassende in $^1/_{100}$ ccm geteilte auf Einsaugen geeichte Kapillarpipetten.

Zur Enteiweißung des Blutes dienen gleichartige Pipetten und wird ein 5 ccm fassender, graduierter Meßzylinder mit eingeschliffenem Stopfen gleicher Art wie als Vorlage beim Destillationsapparat (s. d.) verwandt.

2. *Geräte zur Veraschung* (Abb. 1). Das zu veraschende Material kommt in ein kleines Kjeldahlkölbchen, das bis zum Beginn des Halses etwa 20 ccm faßt. Das Kölbchen kann — je nach der gewählten Destillationsapparatur — einen für diese Apparatur bestimmten Schliff tragen. Es wird von einem seiner Größe entsprechenden Dreifuß mit Drahtnetz und Halter getragen und mit einem Brenner, der der gleiche wie der zur Destillation dienende ist, erhitzt.

3. *Destillationsapparatur* (Abbildung 2). Dieselbe besteht aus einer den Größen des Kjeldahlkölbchens und einigen Besonderheiten der Destillation kleiner

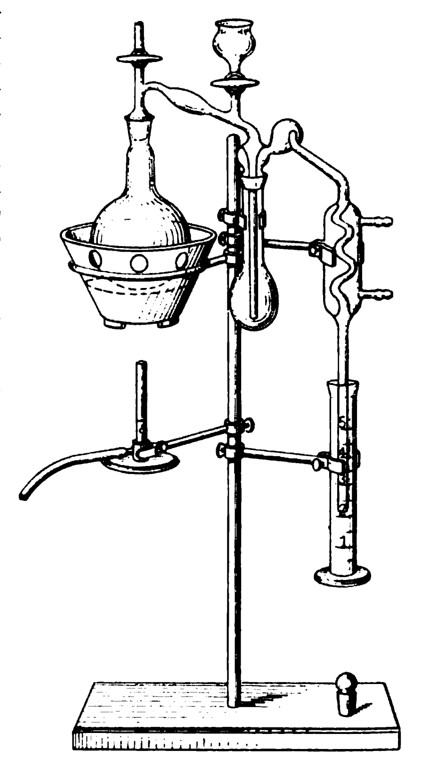


Abb. 1. Etwa $^1/_5$ natürl. Größe.

Abb. 2. Etwa $^1/_5$ natürl. Größe.

[1]) Sämtliche angegebenen Apparaturen werden von der Firma: Vereinigte Fabriken für Laboratoriumsbedarf G. m. b. H., Berlin N 39, Scharnhorststr. 22, in den Handel gebracht.

Mengen angepaßten Wasserdampfdestillationsapparatur. Sie wird von einer Stativstange eines ihr angepaßten Stativs gehalten. Das Stativ trägt:

Mittels federnder Klemme einen Mikrobrenner.

Einen Ring mit Baboblech, in dem das etwa 100 ccm fassende Kölbchen zur Dampferzeugung ruht.

Eine federnde Klemme für den Kjeldahlkolben.

Eine breite federnde Klemme für den Kühler.

Eine Federklemme für das Vorlagegefäß.

Die Destillationsapparatur zeigt als Abweichung von den üblichen größeren Formen: Eine Hahnverbindung des Wasserdampfkolbens mit der Außenluft, eine doppelte Kugelsicherung mit Tropfenfänger gegen Überspritzen des Kjeldahlkolbeninhalts, eine starke Neigung sämtlicher

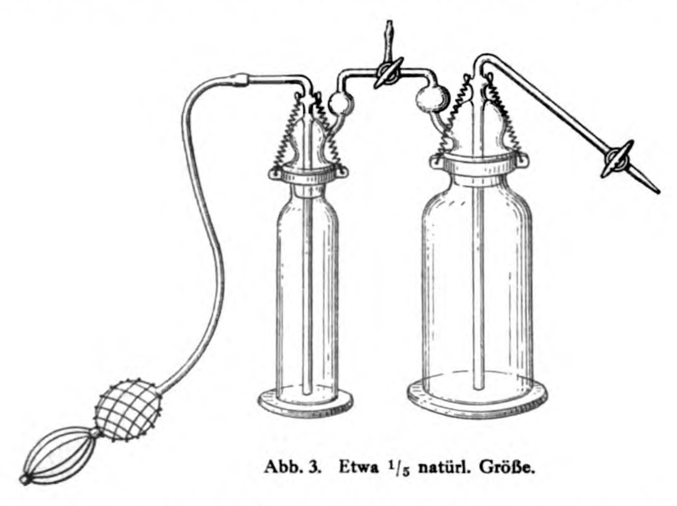


Abb. 3. Etwa $^1/_5$ natürl. Größe.

abführenden Wege, eine für 5 ccm graduierte Vorlage, die zur Erhöhung der Genauigkeit der Abmessung so eng als möglich gewählt ist, aber noch bequem in ihrer ganzen Länge über das Endrohr des Kühlers geführt werden kann. Alle abnehmbaren Glasteile sind mittels Schliff verbunden. Die Apparatur wird mit einer Serie (6 bis 12) zum Schliff der Destillationsapparatur passenden eingeschliffenen Kjeldahlkölbchen von den V. F. L.[1]) geliefert. Die Apparatur kann auch ohne Schliffe nur mit Gummistopfenverbindung geliefert werden, die Destillationen lassen sich mit Genauigkeit auch mit einer Gummistopfenapparatur ausführen. Beobachtungen früherer Zeit, daß Gummistopfen Substanzen abgeben, die mit Nessler Trübungen erzeugen, beruhten auf dem minderwertigen Material des seinerzeit benutzten Kriegsgummis und konnten neuerdings nicht wiederholt werden. Doch gebe ich trotzdem hinsichtlich Genauigkeit, Handlichkeit und Sauberkeit der Schliffapparatur den Vorzug.

4. *Sicherheitsflaschen* (Abb. 3). Zur NH_3-sicheren Aufbewahrung von Lösungen — soweit nicht Säuren und Laugen in Ampullen bezogen werden —

---

[1]) Siehe Fußnote S. 290.

bedarf es gegen die Außenluft gesicherter Aufbewahrungsflaschen. Für die Methodik sind zur Aufbewahrung der Verdünnungsflüssigkeit und der Vorlagesäure zwei Sicherheitsflaschen notwendig.

Dieselben bestehen aus zwei hintereinandergeschalteten, nur Glasverbindung zeigenden Waschflaschen. Da jedes Hineinfallen organischer Substanzen streng vermieden werden muß, sind die Glasteile mit Schliff eingesetzt. Die eingesetzten Teile sind mit den Flaschengefäßen selbst durch zwei an Glashäkchen aufgehängte und daher abnehmbare Federn fest zusammengedrückt. Die kleinere Waschflasche trägt einen Gebläseball. Ein in die Verbindung beider Flaschen eingesetzter Dreiweghahn ermöglicht, entweder die beiden Flaschen miteinander zu verbinden oder eine Kommunikation der kleineren Flasche mit der Außenluft herzustellen und so einen Überdruck aus ihr herauszulassen.

Die größere Flasche wird mit der aufzubewahrenden Lösung, die kleinere mit reinster konzentrierter Schwefelsäure gefüllt, die die aufzubewahrende Flüssigkeit gegen Berührung mit ammoniakhaltiger Luft sichert. Zur Entnahme werden zuerst einige Luftblasen mittels des Gummiballs in das System gedrückt. Sodann läßt man die ersten Tropfen, die vor dem Hahn im Ausflußrohr der Aufbewahrungsflasche sitzen, ausfließen und verwirft sie. Dann erst läßt man die benötigte Menge aus der Apparatur. Durch kurzen Kontakt mit der Außenluft läßt man den Überdruck aus der Schwefelsäurevorlage heraus und verhindert so ein Rücksteigen der Säure in den Gebläseschlauch.

5. *Destillationsapparatur mit absteigendem Liebigschen Kühler und angesetzter Vorlage (Waschflasche, zweckmäßig Schliff) zur Reagensreinigung.*

IV. Reagenzien zur mikrokolorimetrischen N-Bestimmung[1]).

Unabhängig davon, daß von *Kahlbaum* Reagenzien für die Mikrokolorimetrie bezogen werden können, sei die Reinigung der käuflichen und der Lösungen, deren Kauf nicht in Frage kommt, mitgeteilt.

1. *Verdünnungsflüssigkeit.* Zum Verdünnen der einzelnen Lösungen, zum Abspritzen usw., kurz, wozu sonst aqua dest. gebraucht wird, ist gewöhnliches destilliertes Wasser nicht zu brauchen. 4 ccm Wasser + 1 ccm Nesslerreagens (s. d.) zeigen im Meßzylinder bei Durchsicht fast stets deutliche Gelbfärbung. Aber auch Wasser, das scheinbar brauchbar ist, gibt, im Schliffapparat destilliert, an die Vorlage merkbar N ab.

Es zeigt sich hierbei die bei allen weiteren Reinigungsversuchen beobachtete Erscheinung, daß die im Kontakt mit der Luft aufgenommenen Staubteilchen und Partikel, die den Lösungen an sich keine NH_3-Reaktion erteilen, beim Kochen NH_3 bilden. Das Prinzip meiner Reinigung ist daher, die Lösungen in alkalischem Milieu in geschlossener Apparatur (Destillationsapparat nach *Liebig*, am besten Schliffapparat) so lange zu kochen, bis sie bei weiterem Kochen kein NH_3 mehr abgeben, und sie dann unter Abschluß von der Luft aufzuheben.

---

[1]) Reinste konzentrierte Schwefelsäure und Kjeldahllauge „für die Mikrokolorimetrie nach *Kleinmann*“ sind unter dieser Bezeichnung von der Firma C. A. F. Kahlbaum Berlin-Adlershof zu beziehen. Die Lösungen kommen in den für je eine Analyse bestimmten Mengen in Ampullen in den Handel, konzentrierte H_2SO_4 1 ccm, Kjeldahllauge 4 ccm. Auf den Ampullen ist vermerkt, welchen Blindwert in μg N 1 Ampulle Säure + 1 Ampulle Lauge aufweisen.

Da das Wasser durch Kochen mit Alkali stets zu einer schwachen Lauge bzw. nach Neutralisation zu einer Salzlösung wird, bezeichne ich die zu unseren Versuchen dienende, die Rolle des Wassers ersetzende Lösung als Verdünnungsflüssigkeit.

Sie wird am besten selbst folgendermaßen bereitet. Reines destilliertes Wasser wird mit einigen Tropfen reinster Kjeldahllauge (s. d.) versetzt und in einem Jenaer Rundkolben mit absteigendem Kühler, der in eine verschließbare Saugflasche als Vorlage eingesetzt ist — am besten verwendet man die unter III.. 5. angegebene Schliffdestillationsapparatur — gekocht. Man setzt das Kochen so lange fort, bis die Flüssigkeit zu $^1/_3$ bis $1/_2$ eingeengt ist. Dann läßt man erkalten und verschließt den Tubus der Vorlage, damit nicht unnötig Luft eindringt.

Den Rückstand (nicht das Destillat!!) prüft man im Blindversuch (s. d.) (nicht direkt!) auf NH_3-Freiheit. Gibt er noch NH_3 ab, wird er weiter eingekocht, ist er NH_3-frei, so wird er in der Sicherheitsflasche aufbewahrt. Es ist zweckmäßig, sich gleich einen größeren Vorrat herzustellen. Es muß betont werden, daß es nicht genügt, die Flüssigkeit direkt mit Nessler zu prüfen, sondern es muß eine richtige Blindwertprüfung, wie unten beschrieben, ausgeführt werden.

Um Irrtümer durch die Alkalität der Lösung zu verhüten, ist es zweckmäßig, sie mit wenigen Tropfen einer aus NH_3-freier Schwefelsäure hergestellten Säureverdünnung gegen Lackmus zu neutralisieren und dann erst in die Vorratsflasche zu füllen.

2. *Kjeldahllauge.* Die Kjeldahllauge wird entweder fertig in Ampullen bezogen oder wie die Verdünnungsflüssigkeit gereinigt, d. h., reinste N-freie Kjeldahllauge *Kahlbaum* wird wie unter 1. beschrieben unter Zusatz von Siedeperlen und nach Zusatz des gleichen Volumens destillierten Wassers so lange (in der Destillationsapparatur) eingekocht, bis das Ausgangsvolumen der Lauge wieder erreicht ist. Dann Blindversuch. Wenn die Lauge noch nicht NH_3-frei, Zusatz des gleichen Volumens Wasser und erneutes Einkochen. Das Einkochen muß in der Destillationsapparatur erfolgen, da nur dann eine Verunreinigung durch Kontakt mit der Luft verhütet wird.

3. *Schwefelsäure.* Schwefelsäure ließ sich durch Destillation (verwandt wurde hier das Destillat) nicht reinigen. Reinste Schwefelsäure pro analysi *Kahlbaum* zeigte mitunter ausreichende Reinheit. Der NH_3-Gehalt wechselte bei verschiedenen Chargen. Beliebige Schwefelsäure pro analysi *Kahlbaum* muß daher erprobt werden (Blindversuch). Ausgesucht reine Schwefelsäure wird für die Mikrokolorimetrie von *Kahlbaum* geliefert.

4. *Vorlagesäure.* Diese Lösung dient als Vorlage bei der Destillation des NH_3. Es wird eine etwa n/50 H_2SO_4-Lösung benutzt. Dieselbe wird durch Verdünnen von 0,5 ccm reinster konzentrierter H_2SO_4 mit bestem aqua dest. zu 1000,0 hergestellt. Es kann aqua dest. verwandt werden, da einmal nur 1 ccm Vorlagesäure zur Anwendung kommt, und weil die Lösung nicht gekocht wird und daher kein Ammoniak aus Staub usw. entwickeln kann. Die Vorlagesäure wird ebenfalls in Sicherheitsflaschen aufgehoben.

5. *Kupfersulfatlösung.* Aus reinstem Kupfersulfat pro analysi wird mit aqua dest. eine 10proz. Lösung hergestellt. Aufbewahrung in gewöhnlicher Flasche.

6. *Nesslerreagens.* Für ein geeignetes Nesslerreagens wird zuerst ein Nesslerreagens nach *Autenrieth* und *Königsberger* als Stammlösung hergestellt. Hierzu werden 10 g Mercurijodid mit etwas Wasser verrieben, das einem Volumen von 100 ccm entnommen ist. Dasselbe wird mit weiterem

Wasser in eine dunkle Flasche gespült und mit dem Rest des Wassers, in dem man 5 g Jodkalium und 20 g Ätznatron gelöst hat, versetzt. Diese Lösung bleibt 24 Stunden stehen, wonach sich der Bodensatz gut abgesetzt hat und dient als Stammlösung für mein Reagens.

Für dieses werden 20 ccm der völlig klaren, über dem Bodensatz stehenden Stammlösung vorsichtig abpipettiert. 20 ccm einer genau 1,0proz. Jodkaliumlösung, 50 ccm einer n/1 Natronlauge und 10 ccm aqua dest. werden zugefügt und gut umgeschüttelt.

Von diesem Reagens werden für je 4 ccm zu nesslerisierender, neutraler bzw. schwach saurer Lösung 1,0 ccm angewandt.

Das Reagens bleibt im allgemeinen klar, wenn man die Stammlösung vorsichtig klar abgenommen hat. Setzt sich ein geringer Bodensatz ab, so bleibt das Reagens über ihm stehen und wird zum Gebrauch vorsichtig abpipettiert.

Die genaue Konzentration der Jodkalilösung ist wesentlich, da bei zu geringem Jodkaligehalt die Lösungen trüben, bei zu hohem keine Proportionalität mehr vorhanden ist. Es ist daher ratsam, diese öfters frisch zu bereiten[1]).

Das Reagens zeigt unter den angegebenen Bedingungen in 5 ccm Gesamtvolumen Flüssigkeit vollkommen klare, mindestens 30 Minuten ohne jede Änderung haltbare Färbungen, die in einem Bereich von 10 bis 80 μg N in dem 5 ccm Volumen gut meßbar sind und völlige Proportionalität zwischen Farbtiefe und Schichthöhe aufweisen. Bei einem Übersteigen der Konzentration über 80 μg N in 5 ccm sowie bei längerem Stehen der nesslerisierten Lösungen zeigen dieselben Trübungen. Lösungen von einer Konzentration unter 10 μg in 5 ccm Volumen sind selbst bei 60 mm Schichthöhe nicht mehr meßbar. Da 2 ccm Flüssigkeit + 0,5 ccm Nessler sich noch gut abmessen lassen, reicht die Bestimmungsbreite bis zu 5 μg N hinunter.

Die genaue Proportionalität zwischen Konzentration und Schichthöhe zeigt Tabelle I im Anhang.

V. Ausführung der N-Bestimmung.

1. *Vorbereitung der Apparatur.* Zur Ausführung einer mikrokolorimetrischen N-Bestimmung wird zuerst die Destillationsapparatur mit aqua dest. und dann mit Verdünnungsflüssigkeit gereinigt. Sodann wird das Wasserdampfkölbchen mit Verdünnungsflüssigkeit zu drei Viertel gefüllt und die Apparatur — mit leerem Kjeldahlkölbchen — zusammengesetzt. Man leitet jetzt, ohne Vorlage, durch Erhitzung des Rundkölbchens Wasserdampf durch die leere Apparatur, reinigt sie also durch „Ausdampfen“. Nachdem man etwa 3 Minuten ohne Vorlage Dampf durchgeleitet hat, füllt man in das gereinigte, als Vorlage dienende 5-ccm-Meßgefäß etwa 1 ccm Vorlagesäure und destilliert, während das Kühlerendrohr in die Vorlage eintaucht, etwa 3 ccm Flüssigkeit hinüber. Man kann die Menge destillierten Wassers gut an der Teilung des Vorlagegefäßes erkennen. Durch Hinabziehen der

[1]) Es empfiehlt sich überhaupt das Nesslerreagens, speziell die modifizierte Verdünnung des Stammreagenses frisch anzuwenden. Über zwei Wochen alte Reagenzien zeigen mitunter keine Proportionalität mehr bei Färbung verschiedener NH_3-Konzentrationen.

Vorlage wird die Destillation beendet. Man kann die Reste Flüssigkeit, die im Kühlerrohr bleiben, dadurch hinabfließen lassen, daß man das Rundkölbchen durch Hahnöffnung mit der Außenluft verbindet. Der hierbei erfolgende Rückstoß läßt das Kühlerrohr leerfließen. Zu den 4 ccm Destillat werden 1 ccm des modifizierten Nesslerreagenses gesetzt. Die bei der Betrachtung durch die Schichthöhe des Meßgefäßes beobachtete Färbung darf nicht mehr gelblich sein, sondern nur den leicht grünlichen Schein des Neßler haben. Bei auch nur geringer Vertrautheit mit der Methodik erkennt man sofort Ammoniakspuren bzw., wenn nicht vorhanden, die Reinheit des Destillationssystems.

Wenn nicht eine Serie von Bestimmungen hintereinander vorgenommen wird, muß diese Prüfung des Systems stets der Bestimmung vorhergehen. Auch bei Einfüllung tadelloser Verdünnungsflüssigkeit in den Rundkolben gibt die Apparatur, wohl durch Eindringen der atmosphärischen Luft, wenn sie einige Zeit steht, stets Ammoniakspuren bei der Destillation ab. Sie muß daher stets erst rein gekocht werden, und man muß sich durch Destillation und Prüfung des Destillats von der Reinheit überzeugen.

Besonders notwendig ist dies bei Ingebrauchnahme einer neuen Apparatur. Trotz sorgfältiger Reinigung mit aqua dest. zeigen derartige Apparaturen Ammoniakabgaben, und man muß sie eine ziemlich lange Zeit auskochen — eventuell muß man mehrmals neue Verdünnungsflüssigkeit in das Rundkölbchen füllen — ehe die Apparatur wirklich N-frei ist. Diese Erscheinung ist — wie schon bei der Reagensreinigung ausgeführt — so zu erklären, daß Staubteilchen, während sie verkochen, Ammoniak abgeben.

2. *Bestimmung des Reagensblindwertes.* Zur Bestimmung des Blindwertes der gesamten zur N-Bestimmung gebrauchten Materialien werden 1 ccm konzentrierter H_2SO_4 (1 Ampulle) in das Kjeldahlkölbchen gefüllt. Hierzu kommen 2 Tropfen Kupfersulfatlösung. 3 ccm Verdünnungsflüssigkeit werden hinzugefügt, worauf die Mischung unter der Wasserleitung abgekühlt wird. Das Kjeldahlkölbchen wird bei geöffnetem Hahn des Rundkolbens in die Destillationsapparatur eingesetzt. In das Vorlagegefäß wird etwa 1,0 ccm Vorlagesäure gefüllt; das Gefäß wird so eingesetzt, daß das Kühlerrohr eintaucht. Nun werden in das Trichterchen der Apparatur 4 ccm Kjeldahllauge (gereinigt) oder 1 Ampulle (*Kahlbaum*) gefüllt. Jetzt erst wird der Hahn des Rundkölbchens geschlossen, damit durch Abkühlen des heißen Kolbeninhaltes kein Rücksaugen stattfindet. Die Lauge wird durch den Trichter in das Kjeldahlkölbchen fließen gelassen. Der Hahn ist vor dem völligen Abfließen wieder zu schließen. Nunmehr wird durch Erhitzen des Rundkolbens destilliert. In 1 bis 2 Minuten ist die Vorlage bis zu etwa 3 ccm gefüllt. Man zieht sie herunter, so daß das Kühlerrohr

austaucht, öffnet den Rundkolbenhahn, wodurch die letzten Spuren des Kühlerrohrinhalts herausgedrückt werden, und spritzt mit wenigen Tropfen aqua dest. das Kühlerrohr von außen ab. Zu dem Destillat werden im gleichen Meßgefäß 1 ccm Nesslerlösung zupipettiert, worauf das Volumen auf 5 ccm mit aqua dest. gebracht wird. In ein gleiches 5-ccm-Meßgefäß wird 1 ccm einer Ammoniumsulfatlösung gebracht, die in einem Kubikzentimeter 1 μg N enthält (s. Vergleichslösung). Zu diesem werden 1 ccm Vorlagesäure, 1 ccm Nessler und aqua dest. zu 5 ccm gegeben. Die beiden Lösungen werden auf Durchsicht in ihrer Längsachse bei gleicher Schichthöhe gegen ein weißes Papier verglichen. Exakte kolorimetrische Messungen bei so geringer Konzentration haben keinen Sinn. Der Blindwert läßt sich auf diese Weise leicht schätzen. Eventuell ist eine Vergleichslösung, die 2 μg N enthält, herzustellen. Bei sorgfältigstem Arbeiten gelingt es, den Blindwert nicht größer als 1 μg N werden zu lassen. Gewöhnlich betrug er bei meinen Messungen zwischen 1,0 bis 1,5 μg N.

Auf gleiche Weise wie den Gesamtblindwert der Reagenzien prüft man den Blindwert der einzelnen Reagenzien bei der Reinigung derselben. Man destilliert sie mit 4 ccm Kjeldahllauge, nachdem man sich von dem Blindwert der Kjeldahllauge selbst überzeugt hat. *Niemals soll ein Reagens direkt nesslerisiert werden, sondern stets das Destillationsprodukt.*

3. *Die eigentliche N-Bestimmung.* Kennt man den Blindwert der angewandten Materialien, so bestimmt man den N-Gehalt der Untersuchungssubstanz.

Die untersuchte Substanz bzw. Lösung wird in das Kjeldahlkölbchen gefüllt, mit 1 ccm (1 Ampulle) konzentrierter Schwefelsäure und mit 2 Tropfen Kupfersulfatlösung versetzt und mittels Mikrobrenner erhitzt. Reine organische Substanzen sind in 2 bis 3 Minuten (Harnstofflösungen), Blut usw. in 3 bis 5 Minuten völlig verascht, nachdem sich Schwefelsäuredämpfe im Kölbchen gebildet haben. Man läßt abkühlen, fügt 3 ccm Verdünnungsflüssigkeit hinzu, kühlt unter Wasser und destilliert wie oben beschrieben mit 4 ccm (1 Ampulle) Natronlauge und 1 ccm Vorlagesäure. Die Destillation dauert nur 2 bis 3 Minuten.

Die Vorlage wird genau wie unter 2. beschrieben behandelt, mit 1 ccm Nesslerlösung versetzt und zu 5,0 ccm aufgefüllt. Der Schliffstopfen der Vorlage gestattet ein sauberes Durchmischen.

Als Vergleichslösung gebraucht man Ammoniumsulfatlösung. Reinstes Ammoniumsulfat (pro analysi *Kahlbaum*) wird zu 2,3580 g zu 500 ccm gelöst. Die Lösung enthält 1 mg N pro Kubikzentimeter. Eine Verdünnung 1 : 100 enthält also 10 μg N pro Kubikzentimeter. Diese Lösung dient als Vergleichslösung. Zum Vergleich kommt die der untersuchten Menge möglichst nahestehende N-Menge in das Meßgefäß, hierzu 1 ccm Vorlagesäure, 1 ccm Nessler, aqua dest. zu 5,0.

Der Vergleich erfolgt im Mikrokolorimeter innerhalb der ersten halben Stunde nach Reagenszugabe. Die Schichthöhen verhalten sich umgekehrt wie die Konzentrationen.

Das Bestimmungsbereich liegt zwischen 10 und 80 μg N in 5 ccm Volumen. Enthält das Destillat über 80 μg, so muß es rasch zu 9 ccm mit Wasser verdünnt werden, worauf noch 1 ccm Nessler zugefügt wird. Enthält es weniger als 10 μg, so wird es in ein Schälchen gegossen und, nachdem die Gefäße nachgespült worden sind, mitsamt der Spülflüssigkeit auf etwa 1 ccm schnell eingeengt. Derselbe wird in das Meßgefäß überführt, die Schale mit 1 ccm nachgespült, 0,5 ccm Nessler zugefügt und die Lösung genau auf 2,5 ccm gebracht. Auf diese Weise kann man, wenn auch mit etwas mehr Mühe, bis auf 5 μg N mit der Bestimmung hinuntergehen[1]). Von dem Analysenresultat muß der Blindwert abgezcgen werden. Derselbe beträgt, wenn man die Mitte des Bestimmungsbereiches, also etwa 35 μg der Rechnung zugrunde legt, zwischen 3 bis 5 Proz. der zu analysierenden N-Menge.

4. *Die Genauigkeit der N-Bestimmung* wird durch Tabelle II im Anhang erläutert.

Es wurde eine Lösung von reinstem Harnstoff (für wissenschaftliche Zwecke, *Kahlbaum*) von 10 μg N pro Kubikzentimeter hergestellt und wie beschrieben analysiert.

Die Tabelle II zeigt, daß die Abweichungen der gefundenen Werte von den theoretischen 1,8 Proz. im Durchschnitt betrugen, wenn sich die analysierten N-Mengen zwischen 10 bis 80 μg bewegten. Unter 10 μg Analysen N kann der Fehler etwas größer werden.

VI. Anwendung der mikrokolorimetrischen N-Bestimmung für die Gesamt-N und Rest-N-Bestimmung im Blut.

Blutentnahme. Aus dem gereinigten Ohrläppchen läßt man nach Stich mehrere Tropfen in das oben beschriebene Blutaufnahmegefäß fallen, in das vorher wenige Stäubchen pulverisierten Natriumfluorids gegeben worden sind. Für die Gesamt-N-Bestimmung — man wird zweckmäßig nicht unter 0,1 ccm pipettieren — sowie für die Rest-N-Bestimmung ohne Parallelbestimmung braucht man 0,1 ccm Blut, wird also eine Spur mehr entnehmen. 4 bis 5 Tropfen genügen.

Für Rest-N-Bestimmung mit Parallelen benötigt man 0,2 ccm, entnimmt also etwa 7 bis 9 Tropfen Blut.

Das Blut wird gut mit dem Natriumfluorid durchgeschüttelt.

Gesamt-N-Bestimmung. Man saugt in die 0,1-Kapillarpipette s. S. 290, III_1 (auf Einsaugen geeicht) 0,1 ccm Blut, bläst die Pipette in ein 50 ccm Meßkolbchen aus, saugt aus einem Bechergläschen, in dem sich 10 bis 20 ccm aqua dest. befinden, mehrmals Wasser in die Pipette hoch, bläst dieses wieder in das

---

[1]) Es ist notwendig, hierbei einen Blindversuch auf genau gleiche Weise anzustellen, da beim Einengen der sauren Lösung NH_3 aus der Luft aufgenommen werden kann, wodurch der übliche Blindwert größer wird.

Meßkölbchen usf., bis die Pipette völlig rein ist. Sodann gibt man noch das Wasser des Bechergläschens, in das man die Pipette tauchte, zum Meßkölbchen und füllt dieses bis zur Marke. 1 ccm der Verdünnung = 0,002 ccm Blut dient zur Analyse.

Das Resultat, multipliziert mit 50000, gibt die Milligramme N in 100 ccm Blut.

Rest-N-Bestimmung. 0,1 ccm Blut wird in einer 0,1-ccm-Einsaugpipette, wenn man ohne Parallelen arbeitet, 0,2 ccm Blut in 0,2-ccm-Einsaugpipette, wenn man mit Parallelen arbeitet, abgemessen, in das 5-ccm-Meßgläschen geblasen und wie oben beschrieben mit Wasser — diesmal aber nur mit 2 bis 3 ccm — nachgespült.

Das lackfarben gewordene Blut wird mit 0,2 ccm 10proz. Natriumwolframatlösung und mit 0,2 ccm $^2/_3$ n H_2SO_4 (= 1,34 ccm n/10 H_2SO_4) versetzt und umgeschüttelt. Schlägt die Farbe nicht in braun um und schäumt die Lösung, so setzt man noch bis zu 4 Tropfen n/10 H_2SO_4 hinzu. Durch kräftiges Schütteln mit aufgesetztem Schliffstopfen enteiweiße man. Die Mischung muß braun sein, darf nicht schäumen und muß völlig klar filtrieren.

Durch ein ganz kleines Filterchen wird abfiltriert. Es gelingt leicht, über 3,0 ccm Filtrat zu gewinnen. Hat man 0,1 ccm Blut verwandt, so werden 3,0 ccm des Filtrats, hat man 0,2 ccm angewandt, zweimal je 1,5 ccm des Filtrats zur Analyse verwandt. N-Bestimmung wie oben. Die erhaltene N-Menge multipliziert mit 1666,67 ergibt die Milligramme Rest-N in 100 ccm Blut.

Es wurden zur Prüfung der Methode vergleichende Gesamt-N- und Rest-N-Bestimmungen an Blut und Serum auf mikrokolorimetrischem Wege und mittels Makro-N-Bestimmung mit acidimetrischer Titration mit n/20 Lösungen durchgeführt.

Die Ergebnisse, die Tabelle IV im Anhang widergibt, zeigen die ausgezeichnete Übereinstimmung der Methoden.

Die mikrometrische Methodik ist genau so zuverlässig wie die Makro-N-Bestimmung, sie ist weit einfacher als die genaue und daher umständliche Beschreibung zuerst erscheinen läßt, sie ermöglicht Bestimmungen in wenigen Tropfen Blut und ist in 15 bis 20 Minuten bequem durchführbar.

VII. Anhang.

Tabelle I.

Prüfung des Nesslerreagens.

Kolorimeter links			Kolorimeter rechts			Abweichung
Angewandte N-Menge γg	Durchschnitt aus zehn Ablesungen	Schichthöhe	Angewandte N-Menge γg	Durchschnitt aus zehn Ablesungen	Schichthöhe	Proz.
20	110	29,2	10	80,8	58,4	0,0
20	110	29,2	40	124,6	14,6	0,6
32	120,6	19,2	16	101,2	38,0	0,5
64	120,6	19,2	32	100,3	38,9	1,6
80	120,6	19,2	40	100,6	38,6	1,3
80	120,6	19,2	64	115,2	24,0	0,6

Tabelle II. Harnstoffanalyse.

Kolorimeter links			Kolorimeter rechts						
Ammonsulfatlösung µg N	Einstellung links	Schichthöhe	Angew. Harnstoffmenge µg N	Durchschnitt aus zehn Ablesungen	Schichthöhe	Berechnete N-Menge	Blindwert	Gefundene Harnstoffmenge µg N	Abweichung Proz.
5	90	49,2	5	91,0	48,2	5,1	1,25	4,75	5,0
10	100	39,2	10	106,1	33,1	11,9	1,5	10,4	4,0
10	100	39,2	10	104,2	35,0	11,2	1,5	9,7	3,0
20	110	29,2	20	111,4	27,8	21,0	1,25	19,8	1,1
30	110	29,2	30	110,9	28,3	31,0	1,25	29,8	0,8
80	120	19,2	80	120,9	18,3	83,2	3,0	80,2	0,3

Tabelle III. Gesamt-N-Bestimmung.

	Mikrokolorimetrisch										Titrimetrisch		
	Kolorimeter links			Kolorimeter rechts									
	µg N	Einstellung	Schichthöhe	1 ccm Ausgangsmaterial verdünnt 0,5 ccm : 250	Ablesung	Schichthöhe	Berechnete µg N	Blindwert	µg N minus Blindwert	mg N in 100 ccm Ausgangsmaterial	Angewandt	mg N in 100 ccm Ausgangsmaterial	mg Differenz der mikrokolorimetr. u. titrimetr. Bestimmungen in mg N pro 100 ccm Blut
Analyse I 1	80	120	19,2	Blut	116,15	23,05	66,5	2,0	64,5	32,25	0,5 ccm Blut	32,1	
2					116,15	23,05	66,5	2,0	64,5	32,35		31,9	
3					116,00	23,20	66,3	2,0	64,3	32,15		32,0	
												31,9	
							Durchschnitt:			32,20		31,9	0,3
Analyse II 1	20	110	29,2	Serum	113,64	25,26	22,8	1,5	21,3	10,7	0,5 ccm Serum	11,48	
2					114,26	24,94	23,4	1,5	21,9	11,0		10,82	
3					114,26	24,94	23,4	1,5	21,9	11,0		10,99	
												11,48	
												10,50	
							Durchschnitt:			10,9		11,05	0,15

Tabelle IV. Rest-N-Bestimmung.

		Mikrokolorimetrisch											Titrimetrisch		
		Kolorimeter links			Kolorimeter rechts										
		μg N	Einstellung	Schichthöhe	Material	ccm Filtrat nach Enteiweißung	Ablesung	Schichthöhe	Berechnete μg N	Blindwert	μg N minus Blindwert	mg N in in 100 ccm Ausgangsmaterial	Angewandt	mg N in 100 ccm Ausgangsmaterial	Diff. d. mikrokolorimetr. und titrimetr. Bestimmungen in mg N pro 100 ccm Blut
Analyse I	1	20	120	19,2	0,2 ccm Blut verdünnt zu 5 ccm	1,5	123,7	15,5	24,8	2,25	22,55	41,0	50 ccm Blut verdünnt zu 500 ccm, vom Filtrat 150 ccm	40,9	
	2				0,2 ccm Blut verdünnt zu 5 ccm	1,5	123,7	15,5	24,8	2,25	22,55	41,0			
	3				0,2 ccm Blut verdünnt zu 5 ccm	1,5	123,7	15,5	24,8	2,25	22,55	41,0		40,8	
									Durchschnitt:			41,0		40,85	0,15
Analyse II	1	20	120	19,2	0,2 ccm Serum verdünnt zu 5 ccm	1,5	116,05	23,15	16,6	1,5	15,1	25,1	50 ccm Serum zu 500 ccm verdünnt, vom Filtrat 150 ccm	25,1	
	2				1 ccm Serum verdünnt zu 10 ccm	1	124,98	14,22	27,1	2,0	25,0	25,1			
	3				0,2 ccm Serum verdünnt zu 5 ccm	1,5	115,9	23,4	16,4	1,5	14,9	24,8		25,0	
									Durchschnitt:			25,0		25,05	0,05
Analyse III	1	25	120	19,2	0,1 ccm Blut verdünnt zu 5 ccm	3	120,3	18,9	25,4	1,5	23,9	39,9	50 ccm Blut zu 500 ccm verdünt, vom Filtrat 150 ccm	39,0	
	2				0,2 ccm Blut verdünnt zu 5 ccm	1,5	120,1	19,1	25,1	1,5	23,6	39,4			
	3				0,2 ccm Blut verdünnt zu 5 ccm	1,5	120,0	19,2	25,0	1,5	23,5	39,3		39,0	
									Durchschnitt:			39,5		39,0	0,5

Zur Nephelometerapparatur.

Von

Hans Kleinmann.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 20. September 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bereits in früheren Beschreibungen der Nephelometerapparatur (1) (Nephelometer nach Verfasser der Firma F. Schmidt und Haensch) ist darauf hingewiesen worden, daß es schwer ist, gute Gefäßgläser zur Aufnahme der zu messenden Flüssigkeit für das Nephelometer zu erhalten. Die Schwierigkeit, gut zueinander passende, d. h. auch bei Umtausch völlig symmetrische, die Helligkeit des Gesichtsfeldes nicht verändernde Gläser zu erhalten, wurde vor allem Materialunreinheiten zugeschrieben, da Gläser aus optischem Glas nicht zu erhalten sind. Es wurden daher, um geeignete Gläser zu finden, aus Hunderten von Gläsern einige gut zueinander passende Paare herausgesucht.

Trotzdem auf dieses Erproben der Gläser große Sorgfalt verwendet wurde, kam es doch gelegentlich vor, daß einzelne Untersucher nicht passende Gläserpaare in die Hände bekamen und dann beobachteten, daß der Apparat Unsymmetrie zeigte, d. h. die Einstellung der Fenster auf gleiche Höhe ergab — wenn die Gefäße mit der gleichen Trübung gefüllt waren — nicht gleiche Helligkeit des Gesichtsfeldes oder ließ diese beim Umtausch der Gläser, nachdem bei einer Stellung gleiche Helligkeit erzielt war, vermissen.

Diese Schwierigkeit ließ mich den Ursachen, die das „Nichtpassen" vieler Gläser bedingten, nachgehen und führte zu dem Ergebnis, daß weniger die Unreinheiten, sondern Ungleichheiten im inneren und äußeren Durchmesser der Gläser in Frage kamen. Da die Gläser aus gezogenen Glasröhren hergestellt werden, so ist eine Ungleichmäßigkeit der Rohr-

wandung sowie ein schwankender Innendurchmesser (es handelt sich um Bruchteile von Millimetern) begreiflich.

Diese Schwankung führt nun zu folgender optischer Erscheinung. Es wird, wie bei der Originalbeschreibung des Nephelometers gezeigt (2), durch die zylindrische Form der Gefäße eine Lichtbrechung des auf die Gläser fallenden parallelen Beleuchtungslichtes bedingt.

Es wird daher mittels eines Tauchzylinders und geeigneter Blenden nur Licht innerhalb der „Kaustik" zur Messung entnommen. Der Raum hierfür ist natürlich nicht groß und Abb. 1a zeigt auf einem Durchschnitt der bisher benutzten Gläser, daß das entnommene Lichtbündel dicht an die Randstrahlen der Kaustik hinanreicht. Ändert sich nun die Dicke der Reagenzglaswandung oder ihre Krümmung, so verändert sich auch stark die Brechung, und es kann vorkommen, daß das entnommene Lichtbündel über die Grenzen der Randstrahlen hinausreicht.

Um diesen Mißstand zu beseitigen, werden die Nephelometergläser nunmehr mit einem 2 mm größeren Durchmesser gefertigt, so daß der Raum innerhalb der Randstrahlen etwas größer geworden ist und

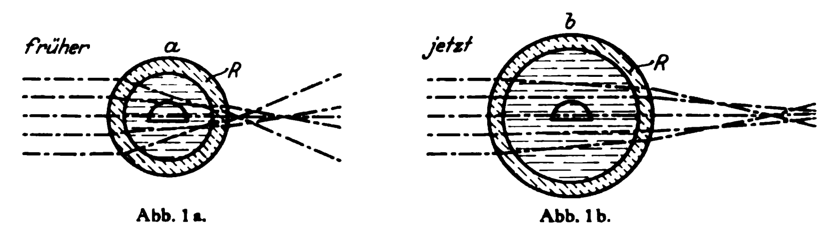


Abb. 1a. Abb. 1b.

Variationen in der Weite der Gefäße optisch nicht mehr in Erscheinung treten können. Hinsichtlich ihrer Reinheit werden die Gläser nach wie vor ausgesucht. Abb. 1a und b zeigt die durch Erweiterung der Gefäße bedingten optischen Verhältnisse.

Das Volumen der Gefäße beträgt durch diese Erweiterung etwa 17 ccm (gegen 12 ccm bei den alten Gläsern), was nicht in Betracht kommt, da alle nephelometrischen, von mir angegebenen Methoden auf 20 ccm Volumen bezogen sind.

Um nun die Stellung der Tauchzylinder absolut sicher zur Kaustik und damit zum Gefäß selbst zu fixieren, wurde der zylindrische Tauchstab konisch ausgebildet.

Hierdurch zentriert sich das an seinem oberen Ende genau wagerecht geschliffene Gefäßglas zwangsläufig beim Hochziehen der Gefäße. Um ein Eintauchen des Tauchstabes ohne Überfließen der Flüssigkeiten zu gewährleisten, sind entsprechende Füllmarken an den Gläsern angebracht. In gleicher Weise ist die Mikrozusatzeinrichtung umgestaltet worden. Das Volumen der nunmehr gebrauchten Mikrogefäße beträgt 5,0 und 3,0 ccm.

Abb. 2 zeigt die durch diese Änderung geschaffene nunmehrige Apparaturform. Den Untersuchern, die Apparaturen der bisherigen ungeänderten Bauart besitzen, erwächst kein Nachteil, da die Firma

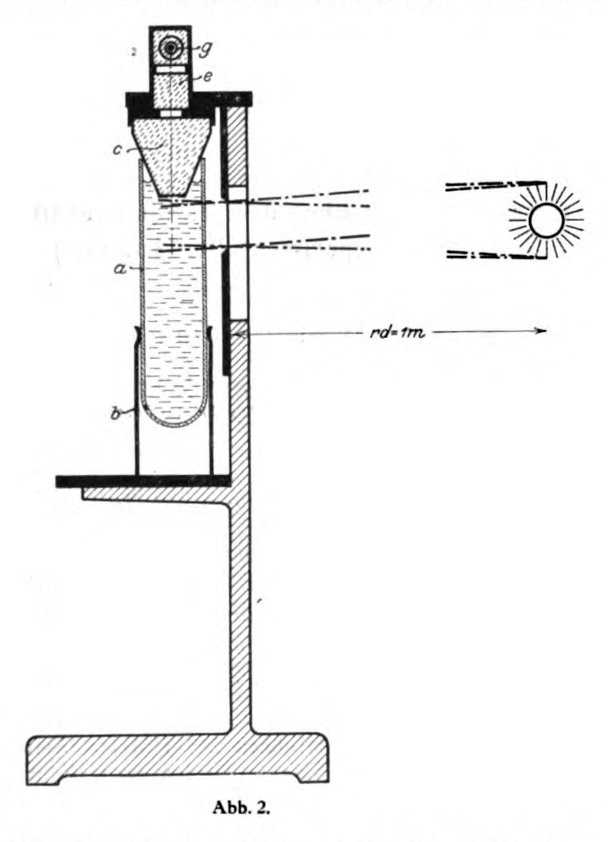


Abb. 2.

Schmidt und Haensch zur Nachlieferung der für diese Apparatur passenden engeren Gläser die genaue Ausprobung gleichwerter, also völlig (optisch) gleichartiger Paare beibehält.

Literatur.

1) *Hans Kleinmann*, diese Zeitschr. **137**, **144**, 1923; Kolloid-Zeitschr. **36**, 168, 1925. — 2) *Derselbe*, diese Zeitschr. **99**, 115, 1919; Kolloid-Zeitschr. **27**, 236, 1920.

Untersuchungen über den Katalasegehalt im Blute bei experimenteller Anämie[1]).

Von

Alexander Bernstein.

(Aus dem Institut für Pathologische Physiologie an dem Odessaer Medizinischen Institut.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Frage nach der Bedeutung der Katalase im tierischen Organismus steht bisher noch offen da, worauf *S. Morgulis* (1) mit Recht hinweist. In der letzten Zeit haben sich die Forscher nun von neuem des Studiums der Rolle der Katalase in verschiedenartigsten Prozessen angenommen, die sowohl im gesunden als auch im kranken Organismus vor sich gehen.

Seit den Untersuchungen von *Jolles* und *Oppenheim* (2), die ein für die Klinik sehr geeignetes Verfahren zur Katalasebestimmung im Blute von Kranken vorgeschlagen haben, wurden noch ziemlich viel klinische Beobachtungen über Blutkatalase bei anämischem Zustande des Organismus veröffentlicht. Von *Jolles* (3), *Jolles* und *Oppenheim*, *Dalmady* und *Torday* (4) u. a. ist eine Abnahme des absoluten Katalasegehalts im Blute festgestellt bei Personen, die an Anämie leiden. *Van Thienen* (5) hat in seinen Beobachtungen über die Blutkatalase den Begriff des Katalaseindex (das Verhältnis der Katalasezahl des Blutes zu der Erythrocytenmenge in 1 cmm) verwendet und gefunden, daß derselbe, in Fällen von einfacher Anämie nur geringe Schwankungen erfahrend, bei perniziöser Anämie stark ansteigt. Diese Ausführungen fanden Bestätigung in den Untersuchungen von *Tögel* und *Geranke* (6), die dem Katalaseindex eine wichtige Bedeutung in der Diagnostik der perniziösen Anämie zumißt.

Andererseits stimmen *Strauss* und *Rammelt* (7), *Neumann* (8), *Segall* und *Händel* (9) und desgleichen *H. Korallus* (10) nicht *van Thienens* Angaben bei und bezweifeln zugleich den diagnostischen Wert des Katalaseindex.

---

[1]) Mitgeteilt auf dem Kongreß f. Inn. Med. in Odessa, 2. September 1925.

In den oben angeführten Literaturangaben bezüglich der Katalase im Blute des Menschen bei Anämie macht sich ein großer Widerspruch in den herrschenden Ansichten bemerkbar. Daher erschien es natürlich angezeigt, das vorhandene Verhältnis zwischen den Schwankungen der Katalase- und der Erythrocytenzahl bei experimenteller Anämie aufzuklären, was sowohl für die theoretische als auch für die praktische Medizin sicher von großem Interesse ist.

In vorliegender Arbeit haben wir es uns zur Aufgabe gemacht, den Katalasegehalt im Blute von Tieren bei experimenteller sowohl hyperchromer als auch einfacher Blutarmut zu untersuchen.

Methodik.

Zur Erzeugung der Hyperchromanämie erhielten Kaninchen subkutan Lösung von Phenylhydrazin-Hydrochlorid in einmaliger Gabe = 0,05 g Salz pro 1 kg Körpergewicht. Einfache Anämie wurde durch wiederholtes Aderlassen aus den Ohrvenen eines Kaninchens in heißem Bade von etwa 45° C hervorgerufen. Blut wurde den Oberflächenvenen des Ohres, bei nüchternem Magen, entnommen und auf den numerischen Gehalt an Erythrocyten, Leucocyten, Hämoglobin und Katalase geprüft. Katalase wurde im Blutstropfen nach der Methode von *Bach* und *Zubkowa* (11) bestimmt. Die Norm untersuchten wir jeden zweiten Tag innerhalb $1\frac{1}{2}$ Wochen.

Bei allen unseren Tieren überstiegen die Schwankungen der Erythrocytenzahl nicht 500000, die des Hämoglobins 5 Proz. nach *Sahli* und die Abweichungen der Katalasezahl vom Mittel waren nicht höher als ± 9 Proz.

Als Versuchstiere haben wir sieben Kaninchen verwendet. Bei fünf von denselben wurde Hyperchromanämie, bei zweien einfache Anämie erzeugt. Alle Kaninchen befanden sich in einem besonderen Raume und erhielten gleiches Futter (Kohl und Gerste).

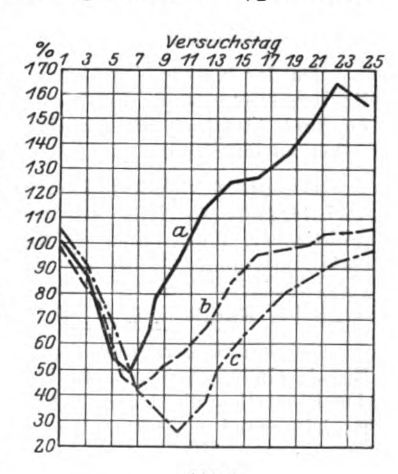


Abb. 1.
a = Katalasezahl.
b = Hämoglobin nach *Sahli*.
c = Erythrocytenzahl.

Experimenteller Teil.

Die von uns ermittelten experimentellen Daten bringen wir in drei Tabellen (Diagrammen) im Text, und desgleichen in Protokollen im Textanhang.

In Abb. 1 ist die Veränderung der Erythrocyten-, Hämoglobin- und Katalasezahl im Blute des Kaninchens Nr. 3 unter dem Einfluß von Phenyl-

hydrazineinspritzungen dargestellt. Die Katalasemenge wird durch Katalasezahl, d. h. der Anzahl Milligramme H_2O_2, die durch 1 ccm 1 : 1000-Blutlösung zersetzt werden, ausgedrückt.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, beginnen die Mengen der drei zu untersuchenden Blutbestandteile bald nach der Phenylhydrazineinverleibung abzunehmen, erreichen am 5. bis 9. Tage eine maximale Abnahme und nehmen dann wieder zu.

Während aber die zunehmenden Hämoglobin- und Erythrocytenmengen (die ersten am 20., die letzteren am 25. Tage) zur Norm zurückkehren, ist die Katalasemenge schon am 11. Versuchstage dem Normalwert gleich, und am 25. Tage steht sie um 55 Proz. über der Norm.

Folglich äußern sich die nach Phenylhydrazineinführung auftretenden Blutänderungen nicht bloß durch Oligozythämie und allgemeine absolute Oligochromämie, sondern auch durch die *absolute Abnahme der Katalasezahl (Hypokatalasämie)*.

Durch Untersuchungen von *Senter*, *Battelli* und *Stern* wurde festgestellt, daß Katalase, die als intrazelluläres Ferment anzusehen ist, mit morphologischen Gewebselementen verbunden ist; die Blutkatalase ist im Erythrocytenstroma enthalten.

Daher ist man zu der Annahme berechtigt, daß die Schwankungen in der Zahl der Katalasen durch folgende zwei Faktoren bedingt werden: entweder durch die Veränderung der absoluten Erythrocytenzahl, oder durch eine solche des Katalasegehalts in den Erythrocyten, oder aber schließlich durch die gleichzeitige Veränderung beider Faktoren.

Eine Aufklärung des Charakters der Katalaseschwankungen gelingt mittels des Katalaseindex, der das Verhältnis der Katalasezahl zu der Erythrocytenmenge in 1 cmm bezeichnet.

Da der Katalaseindex den relativen Katalasegehalt in einer gegebenen Erythrocytenmenge gibt, so sind wir imstande, mittels dieses Index die Zu- und Abnahme der Katalase oder deren normalen Gehalt in den Blutzellen zu ermitteln.

Besagte Zustände dürfen wohl der Kürze und Exaktheit halber durch nachstehende spezielle Ausdrücke, die einen gewissen theoretischen und praktischen Wert haben könnten, bezeichnet werden, und zwar: *Hypercythokatalasämie* — für Katalasezunahme in den Blutzellen, *Hypocythokatalasämie* — für Katalaseabnahme und *Normocythokatalasämie* — für normalen Katalasegehalt in den Blutzellen.

Schwankungen der Katalasezahl bei gleichzeitiger Konstanz des Katalaseindex weisen auf die *indirekte* (von der fermentativen Funktion der Blutzellen nicht abhängige) Veränderungsart hin und können als eine Begleiterscheinung der Oligocythämie beobachtet werden.

Hingegen gibt die Zu- oder Abnahme des Katalaseindex (Hypercytho- oder Hypocythokatalasämie) eine Veränderung des Katalasegehalts im Erythrocytenstroma an und kann vermutlich als Kennzeichen einer Störung der normalen fermentativen Funktion der Zelle dienen.

In Abb. 2 werden die Veränderungen des Katalase- und Farbeindex und desgleichen die absoluten Erythrocytenzahlen bei demselben Kaninchen Nr. 3 angeführt.

Aus dieser Abbildung ist zu ersehen, daß die nach Phenylhydrazininjektion eintretende Oligocythämie nur in den ersten 5 Tagen von Kurven des Katalase- und Farbindex begleitet wird. Nachher geht ein scharfes Auseinandergehen vor sich und die Kurve der anfangs steigenden und dann sinkenden Oligocythämie entfernt sich beträchtlich von dem zunehmenden und später abnehmenden Katalase- und Farbindex. Ferner muß hier auf einen gewissen Parallelismus hingewiesen werden, der im Verlauf der Katalase- und Hämoglobinkurven zu beobachten war.

Folglich ist für Phenylhydrazinanämie nicht allein eine Abnahme der Katalasezahl — die Folge einer stark ausgesprochenen Oligocythämie kennzeichnend —, sondern zugleich auch ein jäher Anstieg des Katalaseindex infolge *einer eigenartigen Störung der fermentativen Funktion der Erythrocyten.* Die Hypercythokatalasämie ist in unserem Falle so stark ausgesprochen, daß sie bereits am 11. Versuchstage (s. Abb. 1) die Hypokatalasämie — eine Folge des anämischen Zustandes des Organismus — kupiert und weiter, ungeachtet der fortdauernden Oligocythämie, *Hyperkatalasämie* auslöst.

Abb. 3 illustriert die Katalase- und Farbindexe bei demselben Kaninchen Nr. 3 (Phenylhydrazinanämie) und beim Kaninchen Nr. 6, das an durch Blutverlust hervorgerufener Anämie litt.

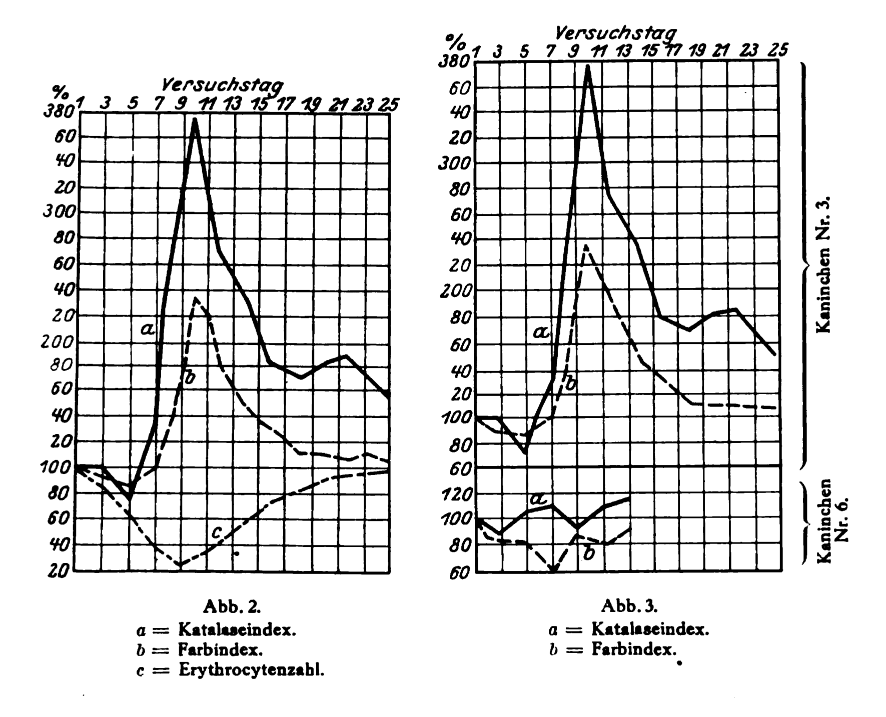


Abb. 2.
a = Katalaseindex.
b = Farbindex.
c = Erythrocytenzahl.

Abb. 3.
a = Katalaseindex.
b = Farbindex.

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß beim Kaninchen mit Phenylhydrazinanämie Hypercythokatalasämie und Hypercythochromie stark ausgeprägt sind; während beim Kaninchen mit einfacher Anämie die Werte des Farb- und Katalaseindex verhältnismäßig normal sind,

obgleich in diesem Falle (Kaninchen Nr. 6) Oligocythämie und Hypokatalasämie *stark an den Tag* treten.

Schluß.

Aus dem Obigen geht hervor, daß die Bestimmung der Katalasezahl allein noch nicht zureichend ist zur Beurteilung einer Störung der fermentativen Eigenschaften des Blutes.

Will man sich einen Aufschluß über den Charakter der fermentativen Veränderungen verschaffen, so muß man, unseres Erachtens, Zuflucht zu dem Katalaseindex nehmen.

Während die Veränderungen der Katalasezahl an und für sich von dem absoluten Katalasegehalt in den Erythrocyten unabhängig sein können, bieten uns die Veränderungen des Katalaseindex eine genauere Vorstellung von dem katalytischen Vermögen der Erythrocyten. Demnach kann die Verminderung der Katalasezahl bewirkt werden: durch eine Verringerung der Erythrocytenzahl, oder durch eine Katalaseabnahme in den Erythrocyten, oder schließlich durch beide Faktoren, und darf daher nicht als Anzeichen von fermentativen Prozessen in den Blutzellen angesehen werden. Dagegen lassen wir den gesteigerten und den herabgesetzten Katalaseindex als das alleinige Zeichen von Erniedrigung oder Erhöhung der fermentativen Funktion von Erythrocyten gelten.

Die Aufklärung des Mechanismus der Katalasezunahme in den Erythrocyten bei Hyperchromanämie stellt ein höchst interessantes Problem dar, dessen experimentelle Lösung uns bisher nicht gelang. Jedenfalls läßt sich eine derartige Zunahme durch eine Rückbildung der erythropötischen Organe in den Embryonalzustand nicht erklären, da durch Untersuchungen von *Lockeman* und *Thies* nachgewiesen ist, daß im Blute von Kaninchenembryonen bei weitem weniger Katalase enthalten ist als im Blute der Mutter.

Zusammenfassung.

1. Bei experimenteller Hyperchromanämie der Kaninchen macht sich eine Abnahme der Katalasezahl und eine gleichzeitige Zunahme des Katalaseindex bemerkbar.

2. Die Katalaseindexzunahme ist bei der Phenylhydrazinanämie deutlicher ausgedrückt als die Farbindexzunahme.

3. Zwischen den Veränderungen des Katalase- und Farbindex läßt sich ein gewisser Parallelismus beobachten.

4. Bei einfacher Anämie sind die Schwankungen des Katalaseindex im Vergleich zu denen bei Hyperchromanämie gering.

Protokolle.

Kaninchen Nr. 1 (Männchen) Gewicht 1950 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
30. VII.	88	5,70	11,36	0,77	1,99	
1. VIII.	84	5,40	9,50	0,77	1,77	
3. VIII.	82	5,90	11,22	0,69	1,90	
5. VIII.	88	5,84	9,69	0,75	1,65	Phenylhydrazin-Einspritzung
Mittlere	85	5,71	10,44	0,72	1,83	
7. VIII.	67	5,30	8,20	0,63	1,54	Poikylocyten
8. VIII.	58	4,80	6,80	0,60	1,41	Polychromat. Anisocyten
9. VIII.	37	3,28	6,46	0,56	1,93	Makrocyten. Seltene Normoblasten
10. VIII.	32	2,55	6,99	0,63	2,74	Makrocyt., Normoblast., 1 Megaloblast
11. VIII.	24	1,04	8,33	1,15	8,00	Polychrom. Anisocyt. Selt. Megaloblast.
13. VIII.	37	1,45	9,15	1,27	6,31	„ „ „ „
15. VIII.	51	2,40	10,20	1,06	4,25	„ „ Selt. Normoblast.
17. VIII.	62	3,30	12,92	0,93	3,91	„ „ „ „
19. VIII.	68	3,90	12,57	0,87	3,21	Schwache Anisocytose. Polychromasie
21. VIII.	74	4,30	12,58	0,86	2,92	Polychromasie
23. VIII.	78	4,60	15,64	0,85	3,40	„

Kaninchen Nr. 2 (Männchen) Gewicht 1780 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
30. VII.	77	5,20	10,01	0,74	2,11	
1. VIII.	79	5,10	11,00	0,77	2,15	
4. VIII.	76	5,40	10,32	0,70	1,99	Phenylhydrazin-Einspritzung
Mittlere	77	5,23	10,44	0,74	2,05	
6. VIII.	64	4,45	8,95	0,72	2,01	Poikylocyten
8. VIII.	55	3,20	7,60	0,86	2,37	„ und Anisocyten
9. VIII.	45	2,45	6,08	0,92	2,48	Polychrom. Anisocyten u. Poikylocyten
10. VIII.	34	1,65	6,45	1,03	3,91	„ „ „ „
11. VIII.	33	1,40	6,90	1,18	4,93	„ „ „ Normoblast.
13. VIII.	35	1,80	8,01	1,03	4,45	„ „ „ „
15. VIII.	39	2,30	8,76	0,84	3,80	„ „ „ „
17. VIII.	48	2,95	9,55	0,86	3,23	„ „ „ „
19. VIII.	60	3,46	9,98	0,86	2,89	„ „ „ „
21. VIII.	68	4,35	11,06	0,79	2,54	„ „ „ „
23. VIII.	74	4,72	12,13	0,78	2,61	„ „ „ „
26. VIII.	76	4,88	12,94	0,78	2,69	Polychromasie

Kaninchen Nr. 3 (Männchen) Gewicht 1600 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
29. VII.	74	4,90	8,35	0,75	1,90	
31. VII.	73	5,20	10,10	0,70	1,94	
2. VIII.	75	5,00	9,86	0,75	1,97	Phenylhydrazin-Einspritzung
Mittlere	74	5,03	9,77	0,73	1,93	
4. VIII.	62	4,30	8,31	0,72	1,93	Poikylocyten
6. VIII.	41	3,44	5,10	0,59	1,48	„
7. VIII.	33	2,40	4,59	0,68	1,91	Anisocytose. Polychrom. Poikylocyten
8. VIII.	31	2,10	5,45	0,73	2,59	Dasselbe. Normoblasten
9. VIII.	36	1,76	7,48	1,02	4,25	„ „
11. VIII.	41	1,24	9,01	1,65	7,26	„ und einzelne Normoblasten
13. VIII.	50	1,90	11,06	1,31	5,29	„ „ „ „
15. VIII.	61	2,80	12,20	1,08	4,35	Schwache Poikylocyt. Anisocytose. Polychrom.
17. VIII.	69	3,45	12,16	1,00	3,52	Dasselbe u. einz. Normoblasten
19. VIII.	70	4,00	13,26	0,87	3,31	Anisocyten. Polychromasie
21. VIII.	72	4,20	14,72	0,85	3,50	Dasselbe
23. VIII.	74	4,50	16,15	0,82	3,59	„
27. VIII.	76	4,90	15,01	0,77	3,06	„

Kaninchen Nr. 4 (Männchen) Gewicht 1930 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
27. VII.	72	5,66	10,54	0,64	1,89	
29. VII.	75	5,25	10,20	0,71	1,94	
31. VII.	71	5,56	11,90	0,64	2,12	
2. VIII.	72	5,82	11,05	0,62	1,90	Phenylhydrazin-Einspritzung
Mittlere	72	5,56	10,92	0,65	1,96	
3. VIII.	52	4,80	7,65	0,54	1,60	Poikylocyten
4. VIII.	30	2,96	5,20	0,50	1,75	Starke Poikylocyt. Schwache Polychrom.
5. VIII.	22	1,60	3,06	0,70	1,91	Dasselbe. Normoblasten
6. VIII.	18	1,60	2,98	0,56	1,80	„ Viele Normobl. Einz. Megalobl.
7. VIII.	21	1,20	3,65	0,87	3,04	„ „ „ „ „
8. VIII.	19	0,78	3,23	1,15	4,15	„ „ „ „ „
9. VIII.	34	1,35	6,51	1,25	4,82	„ „ „ „ „
10. VIII.	45	1,52	7,99	1,48	5,25	Polychromasie. Anisocytose
12. VIII.	59	2,90	9,62	1,02	3,31	„ „
15. VIII.	64	3,95	11,02	0,80	2,79	„
17. VIII.	67	4,35	12,38	0,78	2,84	„
20. VIII.	71	4,80	13,72	0,74	2,85	„

Kaninchen Nr. 5 (Männchen) Gewicht 1595 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
27. VII.	80	5,40	12,01	0,74	2,22	
29. VII.	78	5,00	11,33	0,78	2,22	
31. VII.	81	5,30	11,14	0,76	2,29	Phenylhydrazin-Einspritzung
Mittlere	79	5,23	11,86	0,76	2,26	
1. VIII.	64	4,65	8,17	0,66	1,75	Poikylocyten
2. VIII.	35	3,40	4,81	0,51	1,41	„ Anisocyten
3. VIII.	22	2,00	3,04	0,55	1,52	„ Polychromasie
4. VIII.	16	1,25	2,60	0,64	2,08	Dasselbe u. Normoblasten
5. VIII.	19	0,90	2,69	1,05	3,00	„ Viele Normoblasten
6. VIII.	26	1,15	3,80	1,13	3,30	„ „ „
7. VIII.	32	1,45	4,60	1,10	3,17	„ „ „
8. VIII.	41	1,96	6,70	1,04	3,42	„ „ „
10. VIII.	54	2,50	8,05	1,08	3,22	
12. VIII.	68	2,80	9,21	1,21	3,29	
14. VIII.	76	3,10	11,33	1,22	3,66	
16. VIII.	80	3,76	12,96	1,03	3,50	Dasselbe. Einzelne Normoblasten
18. VIII.	84	4,20	14,08	1,00	3,35	Polychromasie
21. VIII.	87	4,65	15,87	0,93	3,41	„

Kaninchen Nr. 6 (Männchen) Gewicht 1600 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
1. VIII.	81	5,00	10,02	0,81	2,04	
3. VIII.	83	4,80	10,88	0,86	2,27	
5. VIII.	80	4,65	11,33	0,85	2,40	1. Aderlaß
Mittlere	81	4,82	10,73	0,84	2,23	
6. VIII.	55	3,80	8,02	0,72	2,11	2. „
7. VIII.	37	2,62	4,99	0,70	1,90	3. „ Polychrom. Anisocyten
9. VIII.	24	1,74	4,00	0,64	2,28	Starke Anisocytose. Einz. Normoblasten
11. VIII.	36	2,55	5,87	0,51	2,30	Polychrom. Anisocyten
13. VIII.	53	3,36	7,01	0,78	2,08	Polychromasie
16. VIII.	62	4,20	9,81	0,74	2,33	
19. VIII.	70	4,50	11,70	0,77	2,60	

Kaninchen Nr. 7 (Männchen) Gewicht 1450 g.

Zeitangabe 1925	Hämoglobin nach *Sahli*	Erythrocyten in Million.	Katalasezahl	Farbindex	Katalaseindex	Bemerkungen
1. VIII.	65	5,50	9,53	0,59	1,73	
3. VIII.	66	5,15	9,20	0,64	1,74	
5. VIII.	64	5,05	10,12	0,63	2,00	1. Aderlaß
Mittlere	65	5,27	9,62	0,62	1,82	
6. VIII.	48	4,00	7,48	0,60	1,87	2. „
7. VIII.	40	3,20	6,22	0,62	1,94	3. „
9. VIII.	27	2,10	4,50	0,64	2,13	Polychrom. Anisocyten
11. VIII.	32	2,85	5,31	0,56	1,86	Starke Polychromasie. Anisocyten
13. VIII.	40	3,40	7,27	0,58	2,14	Viele Mikrocyten
16. VIII.	51	4,25	8,16	0,60	1,92	Polychromasie
19. VIII.	60	4,95	9,30	0,60	1,89	Schwache Polychromasie
23. VIII.	71	5,40	10,50	0,64	1,90	

Literatur.

1) *S. Morgulis*, Ergebn. d. Physiol. **28**, 308, 1924. — 2) *Jolles* und *Oppenheim*, Virchows Arch. **180**, 185, 1905. — 3) *Jolles*, Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 2083. — 4) *V. Dalmady* und *v. Torday*, Wien. klin. Wochenschr. 1907, S. 457. — 5) *Van Thienen*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **2**, 549, 1920. — 6) *Tögel* und *Geranke*, Wien. Arch. 1924. — 7) *Strauss* und *Rammelt*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **10**, 508, 1922. — 8) *R. Neumann*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **137**, H. 5/6, 324, 1921. — 9) *E. Segall* und *M. Händel*, ebendaselbst **138**, 243, 1922. — 10) *H. Korallus*, ebendaselbst **139**, 252, 1922. — 11) *Bach* und *Zubkowa*, diese Zeitschr. **125**, 283, 1921. — 12) *G. Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 257, 1903. — 13) *Battelli* und *Stern*, Ergebn. d. Physiol. **10**, 531, 1910. — 14) *G. Lockemann* und *J. Thies*, diese Zeitschr. **25**, 120, 1910.

Über den Einfluß des Nahrungsregimes auf den Katalasegehalt im Blute[1]).

Von

Alexander Bernstein.

[Aus dem Institut für pathologische Physiologie des Odessaer staatlichen Medizinischen Instituts (vormals Universität).]

(Eingegangen am 7. Oktober 1926.)

Die weite Verbreitung der Katalase in der Natur bringt es mit sich, daß vor den Forschern das Problem der physiologischen Bedeutung der Katalase entsteht. Bereits über zwei Dezennien werden Untersuchungen über den Katalasegehalt im Organismus unter verschiedenen physiologischen sowie pathologischen Zuständen geführt; und doch liegen bisher, ungeachtet der großen Bemühungen in dieser Richtung, keine genügend überzeugende Befunde über die wirkliche Rolle der Katalase im Organismus vor. Alle vorhandenen Erklärungen der biologischen Rolle der Katalase sind hypothetisch. Unter den vorhandenen Hypothesen findet sich auch die Ansicht, daß zwischen dem Katalasegehalt im Organismus und der Intensität der Oxydationsprozesse ein inniges Verhältnis bestehe.

Diese von *Jolles* (1) und desgleichen von *Lesser* (2) aufgestellte Ansicht gab in ihrer weiteren Ausbildung die Grundlage zu der Hypothese ab, die der Katalase eine wichtige Bedeutung bei verschiedenen Stoffwechselvorgängen beimißt. Besagte Hypothese, die von *Burge* (3) und dessen Mitarbeitern vertreten wird, besteht darin, daß jede Steigerung der Oxydationsprozesse durch eine Mobilisation der Katalase in der Leber und die Einwanderung der Katalase ins Blut begleitet wird. Folglich ist die Leber nach *Burge* der Basispunkt zur Versorgung des Organismus mit Katalase und die Katalase ein den Stoffwechsel steigerndes Ferment. Eine endgültige Vollendung hat die Hypothese von *Burge* in *Magats* (4) Arbeit gefunden, dem es gelang, die Nervenzentren zu entdecken, die den Katalasegehalt im Organismus regulieren. *Magat* hat nämlich beobachtet, daß eine Reizung

[1]) Vorgetragen auf dem II. Allrussischen Kongreß der Pathologen am 18. September 1925. Moskau.

der Wärmezentren die Katalaseproduktion (deren Zunahme im Blute) steigert und die Abseparierung des Corpus striatum dieselbe herabsetzt. *Burges* Ausführungen erfuhren jedoch eine sehr abfällige Beurteilung seitens vieler Forscher. *Morgulis* (5) gelangt auf Grund seiner und anderer Autoren Untersuchungen zu dem Schluß, daß der Katalasegehalt in den Geweben als Maß des Stoffwechsels im Organismus durchaus nicht dienen kann, und daß die Katalase überhaupt kein Oxydationsferment im wahren Sinne des Wortes ist.

In vorliegender Mitteilung haben wir uns, auf Anregung von Prof. *B. A. Schazillo* zur Aufgabe gemacht, den Katalasegehalt im Blute bei Tieren unter verschiedenen Nahrungsbedingungen zu studieren: normale Diät, Hungern und vitaminfreie Diät. Als Versuchstiere dienten uns Tauben, in deren Blute die Katalase wie folgt bestimmt wurde.

Blut wurde durch eine Pipette von 20 cmm aus der Achselgrubenvene angesaugt und in einem Kolben mit 20 ccm destillierten Wassers versetzt. Zu dem auf diese Weise verdünnten Blute gab man 2 ccm 1proz. H_2O_2 (Perhydrol *Merck*) und stellte den Kolben in einen Schrank bei Zimmertemperatur. Nach 30 Minuten wurden in den Kolben 5 ccm 10proz. H_2SO_4 zugesetzt und das nicht zersetzte H_2O_2 mit n/10 Kaliumpermanganat titriert.

I. Die Katalase im Blute normaler Tauben.

Vogelblut unterscheidet sich sehr seinem Katalasegehalt nach von dem Blute der anderen Wirbeltiere. *Battelli* und *Stern* (6), *E. Halif* (7), *Lesser* und auch *Italie* (8) beobachten einen geringen Katalasegehalt im Vogelblut. *Filippi* (9) fand, daß das Blut der Hühner reicher an Katalase ist als das der Säugetiere. In der letzteren Zeit hat *Glinka-Tschernorutzkaia* (10) die Angaben von *Battelli* und *Stern* bestätigt und zudem nachgewiesen, daß das Blut einiger Vogelarten (der Enten und Gänse) gar keine Katalase enthält.

Unsere an einer großen Anzahl von Versuchstieren gemachten Beobachtungen über die Katalase des Blutes normaler Tauben sollten hauptsächlich folgende zwei Fragen aufklären:

1. Welches sind die Unterschiede im Katalasegehalt des Blutes bei verschiedenen Tauben?

2. Wie groß sind die physiologischen Katalaseschwankungen im Blute bei ein und derselben Taube?

Die Versuchstiere waren erwachsene, normal genährte Tauben, die mit Gerste gefüttert wurden. Die Katalasebestimmungen wurden mindestens dreimal jeden fünften und sechsten Tag vorgenommen. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle I als Katalasezahlen, d. h. als durch 1 ccm Blut gespaltene Milligrammengen H_2O_2 wiedergegeben.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß das Blut der von uns untersuchten Tauben sehr geringe H_2O_2-Mengen spaltet. Die durchschnittliche Katalasemenge bei 78 von uns untersuchten Tauben beträgt 0,094, während sie im Kaninchenblut ungefähr 10,0 gleich ist.

Tabelle I.

Nr.	Erste Bestimmung	Zweite Bestimmung	Dritte Bestimmung	Vierte Bestimmung	Mittlere	Die Katalaseschwankung in Proz.
1	109,4	98,5	112,7	100,5	105,3	± 7
2	90,1	78,2	85,0	72,4	81,4	+ 10 — 12
3	39,1	48,3	39,1	37,4	42,2	+ 15 — 8
4	39,1	29,9	30,6	34,0	33,4	+ 14 — 10
5	93,5	73,1	73,1	—	79,4	+ 17 — 8
6	74,8	76,5	85,6	—	78,7	+ 9 — 5
7	74,2	79,9	65,4	76,5	74,0	+ 8 — 11
8	119,0	122,4	129,2	—	123,5	+ 5 — 4
9	119,0	130,9	124,1	—	124,7	± 4
10	57,8	51,0	65,7	54,4	57,2	+ 14 — 12
11	42,5	51,2	51,0	—	48,2	+ 6 — 12
12	102,0	122,4	95,2	91,8	102,9	+ 18 — 11
13	68,0	59,5	85,6	68,0	70,3	+ 21 — 15
14	132,5	100,0	134,3	107,1	118,5	+ 13 — 16
15	170,0	146,2	200,6	154,7	167,8	+ 19 — 13
16	66,8	59,5	80,0	55,0	65,3	+ 22 — 14
17	190,0	187,0	154,7	170,0	175,4	+ 8 — 12
18	64,6	68,0	71,4	73,1	69,3	+ 5 — 7
19	51,0	40,8	42,5	47,1	45,4	+ 12 — 10
20	51,0	56,1	51,0	59,5	54,4	+ 9 — 5
21	66,3	73,1	57,8	64,6	65,4	± 12
22	144,6	183,6	151,3	178,5	164,5	± 11
23	239,7	241,4	216,5	—	232,5	+ 4 — 7
24	76,5	64,6	71,4	73,1	71,4	+ 7 — 10
25	187,3	201,4	193,5	—	193,1	± 4
26	200,6	248,0	216,0	—	221,5	+ 12 — 10

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Erste Bestimmung	Zweite Bestimmung	Dritte Bestimmung	Vierte Bestimmung	Mittlere	Die Katalaseschwankung in Proz.
27	51,0	49,3	41,4	52,6	48,6	+ 8 — 15
28	30,6	28,9	23,4	27,8	27,7	+ 10 — 16
29	93,5	110,5	86,6	—	96,8	± 15
30	112,7	132,3	118,4	130,3	123,4	+ 5 — 9
31	46,6	40,4	37,7	46,6	42,8	+ 9 — 12
32	162,1	150,7	171,1	—	161,3	± 6
33	93,4	90,0	99,6	105,9	97,2	+ 9 — 8
34	82,0	65,8	78,9	84,3	77,7	+ 8 — 13
35	188,1	204,7	208,8	191,5	198,2	± 5
36	143,2	118,6	150,4	137,9	137,5	+ 9 — 13
37	32,7	25,2	33,5	—	30,4	+ 9 — 18
38	40,8	38,4	47,3	50,0	44,1	± 13
39	113,6	98,3	118,9	94,4	106,3	± 12
40	37,1	37,1	44,5	36,7	38,8	+ 15 — 5
41	184,6	202,8	210,1	—	199,1	+ 5 — 7
42	200,0	167,5	184,9	207,5	189,9	+ 9 — 11
43	48,2	64,1	51,8	—	54,7	+ 17 — 12
44	26,6	23,1	29,3	32,6	27,9	+ 17 — 13
45	111,2	139,0	145,0	—	126,9	+ 14 — 12
46	68,8	77,7	62,4	—	69,8	± 11
47	75,1	98,7	87,2	—	87,0	± 13
48	208,8	187,1	198,6	—	198,1	± 5
49	97,8	115,5	114,4	120,1	111,9	+ 7 — 12
50	35,7	48,1	34,7	32,9	37,8	+ 28 — 13
51	21,4	19,8	20,1	22,6	20,9	+ 8 — 6
52	45,0	45,4	31,8	40,0	40,5	+ 12 — 21
53	86,7	99,9	107,8	105,1	102,4	+ 5 — 15

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Erste Bestimmung	Zweite Bestimmung	Dritte Bestimmung	Vierte Bestimmung	Mittlere	Die Katalaseschwankung. in Proz.
54	151,1	170,0	138,4	146,0	151,4	+ 12 — 8
55	145,3	154,1	145,3	—	148,2	+ 4 — 2
56	39,8	51,3	49,1	48,6	47,2	+ 13 — 15
57	48,6	28,7	39,1	40,6	39,2	+ 21 — 26
58	40,0	30,8	35,5	44,1	37,6	± 18
59	73,3	89,0	92,7	80,0	83,7	+ 11 — 12
60	92,0	90,4	69,1	87,5	84,8	+ 8 — 19
61	65,4	54,4	81,1	—	66,9	+ 21 — 19
62	52,1	75,6	68,9	66,2	65,7	+ 15 — 20
63	137,9	102,0	109,1	—	116,2	+ 19 — 12
64	117,0	116,7	139,2	150,1	130,7	+ 15 — 10
65	36,6	28,7	32,4	37,0	33,9	+ 9 — 15
66	183,5	207,0	211,7	219,2	205,3	+ 6 — 10
67	29,8	26,8	30,4	—	29,0	+ 4 — 7
68	126,7	113,7	144,2	—	128,2	± 12
69	80,5	101,8	107,5	94,6	96,1	+ 12 — 16
70	59,0	43,7	40,4	—	47,7	+ 24 — 15
71	106,8	118,2	115,4	103,5	110,9	± 6
72	162,3	159,1	135,6	170,9	156,9	+ 9 — 13
73	141,0	122,6	131,5	144,5	134,9	+ 7 — 9
74	29,0	36,0	30,6	32,3	31,9	+ 13 — 6
75	37,6	35,5	34,6	37,9	36,4	+ 4 — 5
76	62,1	79,9	65,6	83,2	72,7	± 14
77	58,8	36,7	38,4	44,6	44,6	+ 31 — 17
78	93,6	90,9	103,7	—	96,1	+ 7 — 5

In der Tabelle I fällt die große Ungleichheit des Katalasegehalts im Blute verschiedener Tauben auf. Während die katalytische Energie eines Kubikzentimeters Blut der Taube Nr. 51 durch den Wert 20,9 mg gespaltener H_2O_2 zum Ausdruck kommt, spaltet dieselbe Blutmenge der Taube Nr. 23 232,5 mg, was eine Differenz von ungefähr 1000 Proz. ausmacht.

Einen ebenso ungleichen Katalasegehalt im Blute von verschiedenen Individuen ein und derselben Art hat *Becht* (11) gefunden. Zudem geht aus unseren Untersuchungen hervor, daß keine bestimmte Abhängigkeit dieser Differenz von der Farbe und dem Geschlecht des Tieres besteht [worauf *Jolles* (1) schon seinerzeit hinwies]. Ferner sehen wir bei der Betrachtung der Tabelle I, daß das Blut ein und derselben normalen Individuen unter durchaus physiologischen Bedingungen starke Schwankungen des Katalasegehalts an den Tag legt. Dieses Phänomen, das in der letzten Zeit von *Bach* und *Iwanitzky-Wassilenko* (12) an Menschen, Kaninchen und Katzen, von *Bernstein* (13) an Kaninchen beobachtet wurde, findet auch im Blute unserer Tauben statt, wo die Amplitude der Katalaseschwankungen bis auf 50 Proz. des durchschnittlichen Katalasewerts steigt. Der Mechanismus der besagten physiologischen Schwankungen ist nicht klar. Man kann annehmen, daß sie infolge ungenügender Regulierung der Katalaseabgabe und -produktion im Organismus entstehen. Beim Studium des relativen Katalasegehalts in den Geweben des Organismus fand *Lesser* (14) und in der letzten Zeit auch *Burge* Zusammenhang zwischen dem Katalasegehalt im Blute und dem in der Leber. Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, haben wir eine Reihe Katalasebestimmungen in der Leber derselben Versuchstauben vorgenommen, an denen wir den Katalasegehalt im Blute studiert hatten.

Wir bedienten uns folgender Methodik der Katalasebestimmung in der Leber: 12 Stunden nach genommenem Fraß wurde die Taube dakapitiert, die Brusthöhle rasch geöffnet und der Körper zwecks Blutentleerung durch eine in die Brustaorta eingeführte Kanüle mit einer isotonischen NaCl-Lösung von 40° C durchspült.

Nach erfolgtem Durchspülen wurde die Leber absepariert, zerkleinert, in einem Mörser zu Brei zerrieben, auf ein Uhrglas ausgestrichen und in einem von *Wiechowski* (15) konstruierten Apparat getrocknet, sodann zu Pulver zerrieben und in einem Exsikkator über Schwefelsäure bis zur Einstellung eines konstanten Gewichts gehalten. Die Katalasebestimmung geschah in dem auf diese Art bearbeiteten Rückstande des Organs wie folgt: ein Quantum von 0,01 g Pulver wurde in ein steriles Reagenzglas gebracht, 10 ccm sterilen destillierten Wassers zugegeben, das Glas verkorkt und mit Paraffin vergossen. Die Extraktion dauerte 3 Stunden lang im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur. Nach der Extraktion wurden 5 ccm des abzentrifugierten Auszugs mit 20 ccm destillierten Wassers und 30 ccm 1 proz. H_2O_2 in einen Kolben getan, der 30 Minuten in einem Schranke bei 20° C gehalten wurde. Sodann wurde das nicht gespaltene H_2O_2 mit n/10 Kaliumpermanganat titriert und die ermittelten Werte auf 1 g trockenen Organs berechnet.

Die erhaltenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle II angeführt.

Aus Tabelle II ist klar, daß der Katalasegehalt in der Taubenleber bei verschiedenen Individuen nicht gleich ist. So spaltet 1 g Leber der Taube Nr. 20 18,34 g H_2O_2, während dieselbe Lebermenge der Taube Nr. 18 41,20 g H_2O_2 spaltet, d. h. eine doppelt katalytische Energie gegenüber der Leber der Taube Nr. 20 an den Tag legt.

Tabelle II.

Nr.	Katalase im Blut	Katalase in der Leber	Nr.	Katalase im Blut	Katalase in der Leber
12	0,102	19,31	18	0,069	41,20
82	0,146	26,17	19	0,045	36,87
24	0,076	22,60	20	0,054	18,34
15	0,167	37,23	22	0,164	39,82

Andererseits gelingt es nicht, irgendein gesetzmäßiges Verhältnis zwischen dem Katalasegehalt im Blute und in der Leber wahrzunehmen.

Auf Grund der in diesem Kapitel angegebenen Daten erachten wir es für möglich, folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Taubenblut zersetzt verhältnismäßig geringe H_2O_2-Mengen.

2. Im Blute normaler Tauben lassen sich physiologische Schwankungen bis zu 50 Proz. des durchschnittlichen Katalasewertes beobachten.

3. Der Katalasegehalt im Blute verschiedener Tauben ist ungleich, und die von uns gefundene maximale Differenz beträgt annähernd 1000 Proz.

4. Der Katalasegehalt in der Leber normaler Tauben ist nicht gleich und steht in keiner bestimmten Beziehung zu dem Katalasegehalt im Blute.

Einige der besagten Eigentümlichkeiten der Blutkatalase normaler Tauben, nämlich der ungleiche Katalasegehalt bei verschiedenen Individuen und die bedeutende Amplitude der physiologischen Schwankungen, haben uns veranlaßt, in die Methodik der Katalaseuntersuchung bei pathologischen Zuständen zwei Grundbedingungen einzuschalten: einmal, chronische Beobachtungen anzustellen, und dann die Norm möglichst lange vor dem Experimente zu studieren. Die Anwendung des Verfahrens der Katalasebestimmung im Bluttropfen ermöglichte die Erfüllung der ersten Bedingung, und auf das Studium der Norm wurden nicht weniger als 2 Wochen verwandt.

II. Katalase im Blute beim Hungern.

Die Frage nach der Beeinflussung des Katalasegehalts im Organismus durch Hunger ist nicht neu. In den letzten 20 Jahren wurden diesbezügliche Untersuchungen ausgeführt, die schroff widersprechende Resultate ergaben, so daß diese Frage noch offen steht.

Die ersten Katalaseuntersuchungen bei Hungernden wurden von *E. Haliff* (16) angestellt, die gefunden hat, daß lange dauernde Unterernährung (30 Tage) keine Veränderung der Katalasemenge in dem Gewebe des Körpers zur Folge hat. Zu demselben Schluß gelangten *Battelli* und *Stern* (17), die in den Organen weißer Ratten keine Abnahme der Katalase nach neuntägigem Hungern feststellen konnten. *Lesser* (18) beobachtete erhebliche Katalaseabnahme beim Regenwurm nach fünftägigem Hungern, und *Dzerschgowsky* (19) sah dasselbe in der Magenmusosa. Hierher gehört auch eine Reihe Arbeiten von *Burge* und seinen Mitarbeitern. Nach *Burges* (20) und desgleichen nach *Burges* und *Leichsenrings* (21) Angaben verändert Hungern wesentlich den Katalasegehalt im Organismus: diese Autoren konnten eine starke Katalaseabnahme in Organen weißer Ratten beim Hungern verfolgen.

Schon die erwähnten literarischen Daten weisen einen gewissen Widerspruch zwischen den gewonnenen Ergebnissen auf und rechtfertigen eo ipso ein weiteres Studium dieser Frage.

Daher nahmen wir eine Untersuchung über die Katalase bei Tauben vor, die dem Hunger ausgesetzt waren, jedoch Wasser bekamen. Die Zahl der Versuchstiere war acht. Tabelle III bringt die Versuchsergebnisse. Die Katalasewerte repräsentieren die Menge Milligramm H_2O_2 gespalten durch 1 ccm Blut.

Tabelle III.

		Nr. der Tauben							
		1	2	3	4	87	88	89	90
Norm	I. Bestimmung	109,4	90,1	39,1	39,1	166,1	58,6	135,6	101,1
	II. "	98,5	78,2	48,3	29,9	183,4	48,7	98,2	128,3
	III. "	112,7	85,0	39,1	30,6	190,0	72,9	99,1	72,4
	IV. "	100,5	72,4	—	34,0	175,6	81,4	101,8	87,5
	Mittlere	*105,3*	*81,4*	*42,2*	*33,4*	*178,8*	*65,4*	*108,7*	*97,3*
Amplitude der Katalaseschwank. in Proz.		+ 10 — 12	± 7	+ 15 — 8	+ 14 — 10	+ 8 — 7	+ 26 — 27	+ 24 — 10	+ 31 — 26
Hunger	3. Tag	102,0	78,2	37,4	30,8	178,4	79,3	100,0	128,3
	5. "	129,2	79,9	34,0	18,7	147,3	50,1	87,4	99,5
	7. "	129,2	68,8	53,1	27,2	152,1	52,6	90,1	99,5
	9. "	113,9	98,6	28,1	37,6	139,0	—	104,4	68,9
	10. "	—	—	42,5	—	159,9	67,8	—	—
	Mittlere	*118,6*	*81,4*	*39,0*	*28,6*	*155,3*	*62,4*	*104,2*	*99,0*
Amplitude der Katalaseschwank. in Proz.		+ 9 — 14	+ 21 — 16	+ 36 — 28	+ 31 — 35	+ 15 — 11	+ 27 — 20	+ 34 — 16	± 30

Tabelle III veranschaulicht die katalytische Energie bei Hunger. Dabei sind von besonderem Interesse die Mittelwerte des gespaltenen H_2O_2 und die prozentualen Werte der individuellen Schwankungen.

Die Rubrik der prozentualen Werte der individuellen Schwankungen weist einen bestimmten Unterschied in der Schwankungsweite bei normalen und hungernden Tauben auf: bei allen Versuchstieren steigt die Amplitude der individuellen Schwankungen während des Hungerns. Aber trotz der Amplitudeveränderung spalten die Blutzellen während des Hungerns durchschnittlich dieselben Katalasemengen wie in der Norm. Die mittleren Werte der katalytischen Blutenergie unterscheiden sich bei allen unseren Versuchstieren sowohl in der Norm als auch beim Hungern wenig voneinander.

Folglich wird der Katalasegehalt im Blute durch die diätetischen Bedingungen für den gegebenen Organismus, wie es scheint, nicht beeinflußt. Sowohl im Zustande der Sattheit als auch in dem des Hungers zersetzt das Blut bei Tauben dieselben H_2O_2-Mengen, während nach *Burge* die Katalase der Leber beim Hungern weder mobilisiert wird noch ins Blut tritt. Die Hypothese von *Burge* ist, sofern sie die Versorgung des Blutes mit Katalase aus der Leber betrifft, nicht genügend begründet, und wir sind nicht geneigt, die Leber als einen das Blut und die anderen Gewebe des Körpers mit Katalase versehenden Basispunkt anzusehen.

Gibt es denn überhaupt einen Katalasebasispunkt im Organismus? Triftige Belege hierfür liegen bisher jedenfalls nicht vor. Vermutlich produzieren die Blutzellen selbst im Zellinnern ihr Ferment — die Katalase.

Das Obige berechtigt zu nachstehenden Schlußfolgerungen:

1. Der durchschnittliche Katalasegehalt im Blute hungernder Tauben unterscheidet sich nicht von der Norm.

2. Beim Hungern nimmt die Amplitude der individuellen Schwankungen zu.

III. Die Katalase im Blute bei Avitaminose.

Über ein Jahrzehnt bereits fesselt *Funks* (22) Lehre von den Vitaminen und Avitaminosen die Aufmerksamkeit eines großen Teiles der Gelehrtenwelt. Und doch ist die Frage über den Mechanismus der Avitaminosen, ungeachtet einer kollossalen Entwicklung der einschlägigen Literatur, bis heute noch nicht völlig aufgeklärt. Die von *Abderhalden* (23), *Bickel* (24), *Funk* u. a. festgestellte Tatsache der Störung des gesamten und cellulären Stoffwechsels bei vitaminfreier Nahrung veranlaßte einige Forscher, den Grund zu diesen Veränderungen in der Alternation der fermentativen Zusammensetzung der Gewebe zu suchen. In den Arbeiten über die Beteiligung der Fermente an der Entwicklung der alimentären Dystrophie wurde insbesondere die Katalase berücksichtigt.

Dutcher (25), *Dutcher* und *Collatz* (26), die eine erhebliche Katalaseabnahme (50 Proz.) in den Geweben bei B-avitaminösen Tauben entdeckt hatten, stellten eine Hypothese auf, nach der die Entwicklung der B-Avitaminose durch die Katalaseabnahme im Organismus bei Vitaminmangel bedingt wird. *Magat* (27), der sich hauptsächlich auf die Arbeiten von *Dutcher*, *Dutcher* und *Collatz* stützt, gelangt zu dem Schluß, daß sämtliche von ihm im Blute gesunder Menschen beobachteten Fälle von herabgesetztem Katalasegehalt als Zeichen einer an Vitamin armen Nahrung sind. *St.* und *A. Draganesco* (28) fanden einige Verminderung der Katalase in der Leber bei B-avitaminösen Tauben. Andererseits bemerkte *Normark* (29) im Laboratorium von Prof. *Palladin* keine Veränderungen der Katalase im Blute C-avitaminöser Meerschweinchen.

Die Wirkung der Vitamine auf die Katalase wurde auch in vitro untersucht. *Villaroel* (30) hat eine Steigerung der Tätigkeit der Katalaseleber bei Zusatz zu derselben von Bierhefe-, Pankreas-, und Testikelextrakten gefunden. Indem *Villaroel* dieses Aktivierungsvermögen den im Extrakt befindlichen Vitaminen zuschreibt, erachtet er es für möglich, diese Ergebnisse auf den ganzen Organismus zu übertragen. Nach *Sammartino* (31) wird die Aktivierung der Katalase durch Hefeextrakte durch die Milieuveränderung verursacht.

Unsere Versuche wurden an zwei Serien von Tauben angestellt, die einseitiges Futter verabreicht bekamen: zehn Tiere bloß polierten Reis (Handelsreis), die anderen ausschließlich Sonnenblumenöl, das vorher 4 Stunden lang im Autoklaven bei 140° erhitzt war. Wie bei der ersten, so auch bei der zweiten Gruppe entwickelten sich unter dem Einfluß der einseitigen (vitaminfreien) Nahrung Symptome der alimentären Dystrophie: bei der ersten am 20. bis 25. Tage, bei der zweiten am 40. bis 50. Tage. Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen IV und V dargestellt.

Aus den Tabellen IV und V geht hervor, daß bei den avitaminösen Tauben dieselbe Amplitudenveränderung der individuellen Schwankungen statthat wie bei den hungernden. Die Veränderung ist hier etwas schwächer ausgesprochen, als bei den hungernden Tauben, unterscheidet sich jedoch ihrer Größe nach von den Schwankungen, die bei diesen Tauben in der Norm statthatten. Hier verändert sich der Mittelgehalt der Katalase in

Tabelle IV.

		Nr. der Tauben									
		13	14	17	21	52	70	72	74	75	76
Norm	I. Bestimmung . . .	68,0	132,5	190,0	66,3	45,0	59,0	162,3	29,0	37,6	62,1
	II. „ . . .	59,5	100,0	187,0	73,1	45,4	43,7	159,1	36,0	35,5	79,9
	III. „ . . .	85,6	134,3	154,7	57,8	31,8	40,4	135,6	30,6	34,6	65,6
	IV. „ . . .	68,0	107,1	170,0	64,6	40,0	—	170,9	32,3	37,9	83,2
	Mittlere	*70,3*	*118,5*	*175,4*	*65,4*	*40,5*	*47,7*	*156,9*	*31,9*	*36,4*	*72,7*
Amplitude der Katalaseschwankungen in Proz.		+ 21 — 15	+ 13 — 15	+ 8 — 12	± 12	+ 12 — 31	+ 24 — 15	+ 9 — 13	+ 13 — 6	+ 4 — 5	± 14
Reisration	3. Tag der Reisration .	58,4	127,9	127,9	70,1	45,0	54,5	168,9	31,1	33,3	75,5
	7. „ „ „	90,4	115,6	198,6	56,6	37,4	43,6	168,9	39,3	39,6	85,8
	10. „ „ „	92,3	101,3	151,9	50,4	43,1	45,9	177,2	30,4	32,1	61,3
	14. „ „ „	69,6	129,1	173,6	69,8	47,2	34,3	130,1	40,2	35,4	68,9
	18. „ „ „	50,3	102,6	140,2	77,1	36,2	—	156,2	29,9	29,7	76,3
	21. „ „ „	75,3	94,2	147,8	54,2	29,8	—	128,4	—	33,7	—
	25. „ „ „	52,2	—	—	—	30,5	—	—	—	—	—
	Mittlere	*69,8*	*111,8*	*165,2*	*64,7*	*38,4*	*44,5*	*154,9*	*34,2*	*34,0*	*75,5*
Amplitude der Katalaseschwankungen in Proz.		+ 32 — 27	+ 14 — 16	+ 20 — 15	+ 19 — 26	+ 23 — 25	+ 22 — 23	+ 14 — 17	+ 17 — 13	+ 17 — 13	+ 13 — 19

Tabelle V.

		Nr. der Tauben					
		27	28	30	35	60	64
Norm	I. Bestimmung . .	51,0	30,6	112,7	188,1	92,0	117,0
	II. „ . .	49,3	28,9	132,2	204,7	90,4	116,7
	III. „ . .	41,4	23,4	118,4	208,8	69,1	139,2
	IV. „ . .	52,6	27,8	130,3	191,5	87,5	150,1
	Mittlere	*48,6*	*27,4*	*123,4*	*198,2*	*84,8*	*130,7*
Amplitude der Katalase-schwankungen in Proz.		+ 8 — 15	+ 10 — 16	+ 5 — 9	± 5	+ 8 — 19	+ 15 — 10
Ölfutter	7. Tag der Ölration	46,2	29,7	131,4	191,1	59,7	140,1
	14. „ „ „	53,8	31,8	126,2	212,6	91,6	132,2
	20. „ „ „	40,1	32,5	110,2	179,2	94,2	132,2
	27. „ „ „	47,9	25,5	120,1	184,3	67,8	119,4
	32. „ „ „	39,6	22,9	108,6	178,6	60,4	110,7
	42. „ „ „	38,4	23,7	103,9	—	—	114,8
	Mittlere	*44,3*	*27,7*	*116,7*	*189,1*	*74,5*	*125,1*
Amplitude der Katalase-schwankungen in Proz.		+ 21 — 14	± 17	+ 13 — 11	+ 12 — 6	+ 23 — 20	+ 12 — 11

einem bestimmten Blutvolumen, trotz der Steigerung der Schwankungsamplitude, nicht, ebenso wie beim Hungern.

Somit nimmt die Katalasemenge im Blute infolge der vitaminfreien Diät nicht ab, und man darf annehmen, daß der Organismus zur Katalaseproduktion der Vitamine nicht bedarf.

Die von uns beobachtete Konstanz des Katalasegehalts im Blute bei Hunger und Avitaminose ist deshalb von Interesse, weil diese Zustände (Hunger und Avitaminose) bekanntlich von einer Veränderung des Stoffwechsels begleitet werden. Die Veränderung des Stoffwechsels im Organismus steht, wie es scheint, in keinem direkten Zusammenhang mit der Veränderung des Katalasegehalts. Hieraus darf man selbstverständlich nicht den entgegengesetzten Schluß ziehen, daß die Katalaseabnahme im Organismus ohne Einfluß auf die Intensität des Stoffwechsels bleibt. Auf welche Seite des Stoffwechsels hin aber, und ob die Katalase überhaupt auf den Stoffwechsel wirkt, das wissen wir noch nicht. Ebenso ist uns nicht bekannt, welches Katalaseminimum der Organismus für sein normales Leben nötig hat. Vergleichende physiologische Daten zeigen jedenfalls, daß einige Organismen (Vögel) mit ziemlich hoch gespanntem Gaswechsel sich mit einer geringen Katalasemenge begnügen.

Auf Grund der in diesem Kapitel niedergelegten Ergebnisse dürfen wir annehmen, daß die vitaminfreie Diät keinen großen Einfluß auf den Katalasegehalt im Organismus ausübt, und daß nicht in der Veränderung des Katalasegehalts im Organismus eine der Ursachen der avitaminösen Störungen zu sehen ist. Aus denselben Erwägungen halten wir für ungenügend begründet die Ansicht *Magats*, daß schon die Abnahme der Katalase im Blute klinisch gesunder Menschen als Zeichen der Vitaminverminderung im Organismus dienen soll. Wir können gleichfalls auch die Autoren nicht bestimmen, die sich den Verlauf der Oxydationsprozesse

mit der Katalasemenge im Organismus innigst verbunden denken, da aus unseren Ergebnissen ersichtlich ist, daß die Veränderung des Stoffwechsels ohne Störung des Katalasegehalts vor sich gehen kann; und andererseits kann der herabgesetzte Katalasegehalt nicht als Zeichen des erniedrigten Stoffwechsels dienen, d. h. die Katalase kann, wie *Morgulis* richtig bemerkt, nicht als Maß des Stoffwechsels angesehen werden.

Aus dem Obigen lassen sich diese Schlüsse ziehen:

1. Der durchschnittliche Katalasegehalt im Blute ändert sich nicht bei vitaminfreier Diät.

2. Während der Avitaminose steigt die Amplitude der physiologischen Schwankungen bei einzelnen Individuen etwas an.

Ergebnisse.

Das ziemlich umfangreiche Material in vorliegender Arbeit bringt kein Licht in die Frage über die biologische Rolle der Katalase. Die von uns entdeckte Konstanz des Katalasegehalts im Blute der Tauben bei Hunger und Avitaminose sprechen gegen die Hypothese von *Burge* und seinen Anhängern, erklärt aber ebenso wie alle vorhergehenden Arbeiten anderer Autoren die Rolle der Katalase im Organismus nicht. Das Kriterium für ein Urteil über die physiologische Funktion der Katalase gab bisher die Veränderung des katalytischen Vermögens der Gewebe bei verschiedenen Zuständen des Organismus ab. Einige auf diesem Wege entdeckten Veränderungen des Katalasegehalts in den Geweben wurden zur Aufstellung von Hypothesen über die Bedeutung der Katalase verwertet. Allein in dem Maße wie es sich erweist, daß auch im normalen Zustand die Katalasemenge sehr große Schwankungen erfährt, büßen erwähnte Hypothesen und desgleichen das zu ihrer Aufstellung benutzte Kriterium ihren Wert ein. Das einzige, was wir von der Katalase sicher wissen, ist deren Fähigkeit, H_2O_2 in vitro zu spalten. Die Bedeutung dieses Prozesses im Organismus ist uns jedoch nicht bewußt.

Wir sehen uns also gezwungen zuzugeben, daß bis heute noch gar kein Aufschluß über die Rolle der Katalase im Organismus vorliegt und das Verfahren zur Beurteilung der Rolle der Katalase nach deren Gehalt in den Geweben des Organismus unzureichend ist. Unseres Erachtens ist ein anderes Kriterium zur Deutung der biologischen Rolle der Katalase in der Natur aufzustellen.

Schlußfolgerungen.

1. Der Katalasegehalt im Blute bei Tauben ist geringer gegenüber dem bei anderen Tieren.

2. Der Katalasegehalt im Blute verschiedener Tauben ist ungleich; die von uns ermittelte maximale Differenz schwankt in Grenzen von etwa 1000 Proz.

3. Die Amplitude der physiologischen Katalaseschwankungen im Blute bei ein und derselben Taube beträgt bis 50 Proz. des mittleren Katalasewertes.

4. Bei Hunger und B-Avitaminose nimmt der Katalasegehalt im Blute im Vergleich zur Norm nicht ab.

5. Der Katalasegehalt im Organismus kann offensichtlich nicht als Maßstab des Stoffwechsels dienen.

Literatur.

1) *A. Jolles*, Fortschr. d. Med. 1904, Nr. 34, S. 1229. — 2) *E. Lesser*, Zeitschr. f. Biol. **47**, 1, 1906. — 3) *W. Burge*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **7**, 467, 1921. — 4) *J. Magat*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **86**, 104. — 5) *S. Morgulis*, Ergebn. d. Physiol. **28**, 308, 1924. — 6) *F. Battelli* und *L. Stern*, C. r. Soc. de Biol. **57**, 21, 1905. — 7) *E. Haliff*, Zitiert nach *Battelli* und *Stern*, Arch. di fisiol. **2**, 471, 1905. — 8) *Van Itallie*, Zitiert nach *C. Oppenheimer*, „Die Fermente und ihre Wirkungen", S. 397, 1909. — 9) *Filippi*, Zitiert nach *Battelli* und *Stern*, Ergebn. d. Physiol. **10**, 531, 1910. — 10) *E. Glinka-Tschernorutzkaia*, Russk. Physiol. J. **4**, 135, 1922 (russisch). — 11) *F. Becht*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **5**, 282, 1921. — 12) *A. Bach* und *Iwanitzky-Wassilenko*, diese Zeitschr. **148**, 469, 1924. — 13) *A. Bernstein*, Journ. exper. biol. i. medic. **151**, Nr. 3, 1926 (russisch). — 14) *E. Lesser*, Zeitschr. f. Biol. **49**, 575, 1907. — 15) *W. Wiechowski*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. **8**, 282, 1920. — 16) *E. Haliff*, l. c. — 17) *F. Batelli* und *L. Stern*, Arch. di fisiol. **2**, 471, 1905. — 18) *E. Lesser*, Zeitschr. f. Biol. **47**, 1, 1906. — 19) *W. Dserschgowsky*, Arch. biol. nauk. **14**, 137, 1908. — 20. *W. Burge*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **19**, 108, 1923. — 21) *W. Burge* and *M. Leichsenring*, ebendaselbst **9**, 290, 1922. — 22) *C. Funk*, Die Vitamine, 3. Aufl., 1924. — 23) *E. Abderhalden* und *E. Wertheimer*, Pflügers Arch. **198**, 167, 1923. — 24) *A. Bickel*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 29, S. 965. — 25) *A. Dutcher*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **8**, 203, 1921. — 26) *A. Dutcher* und *Collatz*, Zitiert nach *Magat*. — 27) *J. Magat*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **42**, 95, 1924. — 28) *St.* und *A. Draganesco*, C. r. Soc. de biol. **92**, 1470, 1925. — 29) *Normark*, diese Zeitschr. **152**, H. 5/6, 1924. — 30) *Villaroel*, C. r. Soc. de biol. **88**, 376, 1923. — 31) *U. Sammartino*, Ronas Ber. über d. ges. Physiol. **12**, 409, 1922.

Über einige Bindungsarten im Eiweißmolekül.

Von

W. S. Ssadikow.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität zu Leningrad.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1926.)

Es ist bekannt, daß Kollagen nur durch andauerndes Kochen mit Wasser, am besten unter Druck, in Glutin übergeführt werden kann; viel leichter erfolgt die Glutinierung bei Anwendung von 1 proz. Monochloressigsäure. Es gibt jedoch mehrere Kollagenarten bzw. leimgebende Gewebe verschiedener Herkunft (Knochen, Knorpel, Sehnen usw.), die sich durch ihren Resistenzgrad gegenüber den hydrolysierenden Agenzien unterscheiden.

Wenn die hydrolytische Spaltung des Kollagens in der Loslösung von Peptid- oder peptidartigen Bindungen besteht, so muß man erwarten, daß das Glutin die Reaktionen auf freie Aminosäuren, so z. B. mit Triketohydrindenhydrat, gibt. Es hat sich aber gezeigt, daß *das Glutin mit Ninhydrin keine Farbreaktion hervorruft.*

Nicht nur das aus dem Kollagen frisch dargestellte Glutin verhielt sich ninhydrinnegativ, auch die meisten guten Gelatinesorten reagierten nicht mit Ninhydrin. Es ist sechs- und mehrstündige Kochdauer erforderlich, um eine 5 proz. Gelatinelösung ninhydrinpositiv zu machen. Ganz ähnlich verhielten sich Gluteine, die aus hyalinem Knorpel (Nasenscheidewand des Schweines) und elastischem Knorpel (Aorta, Ohr) dargestellt worden waren.

Tatsache ist, daß die Glutinierung des Kollagens einen hydrolytischen Vorgang darstellt, bei dem keine peptidartigen Bindungen angegriffen werden, da keine freien Aminogruppen entstehen.

Die gleiche Erscheinung beobachteten wir bei der Pepsinverdauung sämtlicher Eiweißstoffe: Pepsin wirkt hydrolysierend und läßt die peptidartigen Bindungen unangegriffen, die man somit als *pepsinfest*

und *trypsinlabil* bezeichnen kann. Der Pepsinspaltung zugänglich sind wahrscheinlich äther-, ester- oder anhydridartige bzw. lactonartige Bindungen.

```
I. R·CH——O——CH·R           II. R·CH——O——CO
      |          |                 |         |
      CH·NH2     CH·NH2            CH·NH2    CH·NH2
      |          |                 |         |
      COOH       COOH              COOH      R

III. R·CH2·CH·NH2—CO        IV. R·CH2—CH—CH2—CH·NH2—CO
                     \                  |                  |
                      O                 |__________________O
                     /
     R·CH2·CH·NH2—CO
```

Während das Kollagen eine pepsinlabile und trypsinfeste Struktur besitzt, weist das Glutinmolekül pepsin- und trypsinlabile Beschaffenheit auf. Dagegen sind die Keratine derart gebaut, daß keine leicht angreifbaren Bindungen vorhanden sind. Die Keratine sind pepsin- und trypsinfest und enthalten wahrscheinlich nur zyklische Bindungen, so daß allein destruierende Angriffe (Säuren, Alkalien) pepsin- und trypsinlabile Verbindungen liefern.

Da alle oben erwähnten Eigenschaften bei den ersten hydrolytischen Angriffen bzw. Veränderungen des Proteinmoleküls auftreten, so verdienen sie die größte Aufmerksamkeit; bieten sie uns doch unmittelbar die Möglichkeit, die ursprünglichen Beziehungen zwischen den einzelnen Grundkörpern, aus denen jedes Eiweißmolekül aufgebaut ist, aufzuklären.

Gegenwärtig kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß einzelne „*Grundkörper*" — wir schlagen hierfür den Namen „*Proteone*" vor — komplizierte polyzyklische Systeme darstellen, die „innerlich" verschiedenartig gebaut sind oder aus anders beschaffenen zyklischen Komplexen, Kernen usw. zusammengesetzt sind (z. B. Pyrrol, Prolin, Peptin, Peptozyklin, Piperidinringe usw.). Bisher ist es noch nicht gelungen, die einzelnen Grundkörper (Proteone) zu isolieren und näher zu untersuchen. Trotz aller Schwierigkeiten ist das Problem aber nicht unlösbar und kann auf zwei Wegen verfolgt werden: erstens durch partielle „Mazerierung" einzelner Grundkörper mit Hilfe eines geeigneten, milde angreifenden hydrolysierenden Mittels — wie es z. B. die Fermente sind —; zweitens durch systematische Synthesen von Körpern mit Ringstruktur, indem man von Peptin oder Peptocyklinkernen ausgeht und zu proteinartigen Körpern gelangt.

Eine annähernd orientierende Vorstellung über die Bindungsarten zwischen einzelnen Proteonen können wir uns bilden durch die Unterscheidung von vier Typen, die wir bei einzelnen Vertretern der Eiweißkörper antreffen. Eine Zusammenstellung findet sich in Tabelle I. Außerdem wollen wir versuchen, die einzelnen Typen durch schematische

Strukturformeln wiederzugeben, wobei allerdings nur die *Bindungsarten* berücksichtigt werden können; der innere Bau und die Eigenschaften der Proteone, sowie ihre Zahl sind als bisher unaufgeklärt außer acht gelassen.

Tabelle 1.

	Verhalten gegen peptolytische Fermente	Verhalten gegen Wasser	Verhalten gegen Ninhydrin	Bindungstypus der Proteonen
I.	Pepsinlabil—trypsinfest	Kochend unlöslich	0	Kollagentypus
II.	Pepsinlabil—trypsinlabil	Heiß löslich	0	Glutintypus
III.	Pepsinfest—trypsinfest	Kochend unlöslich	0	Keratintypus
IV.	Pepsinfest—trypsinlabil	Kalt löslich	0	Peptontypus

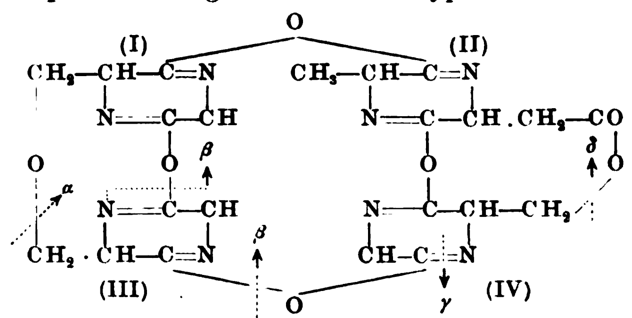
Nimmt man anstatt der Proteone einfache Peptinringe, so lassen sich die hauptsächlichen Verkettungstypen durch folgende schematische Konstruktionen ausdrücken:

I. Kollagentypus.

Pepsinlabil; d. h. es ist eine Äther- oder Esterbindung vorhanden. die durch Trypsin nicht angreifbar ist.

Trypsinfest; d. h. die Peptidbindungen sind sämtlich blockiert; die blockierende Bindung ist durch Pepsin angreifbar.

Kollagen wird durch Trypsin nicht angegriffen, nach vorausgegangener Pepsineinwirkung wird es durch Trypsin verdaut.



Die vier Peptinringe werden durch folgende Bindungen zusammengehalten:

1. α-Bindung: entstanden aus zwei $-CH_2.OH$-Gruppen durch Wasserabspaltung.
2. β-Bindung: entstanden aus zwei $-C(OH)$-Gruppen durch Wasserabspaltung.
3. δ-Bindung: entstanden aus $-CH_2OH$ und aus $COOH$ durch Wasserabspaltung.
4. γ-Bindung: Peptidbindungen durch Anhydrisierung innerlich befestigt, blockiert.

Die α-, β- und δ-Bindungen sind alle pepsinlabil und trypsinfest; am zahlreichsten und wichtigsten sind die β-Bindungen, welche die peptidischen γ-Bindungen vor der Trypsinwirkung schützen.

II. Glutintypus.

Pepsinlabil; d. h. von der Art der α- oder δ-Bindungen.

Trypsinlabil; d. h. die peptidischen γ-Bindungen sind nicht blockiert; keine β-Bindungen vorhanden.

```
                                              δ
                                              ↑
CH₂—CH—COH=N                                  ⁞/CH₂—CH—COH=N
|   |      |                                 O/      |      |
|   N===COH—CH—CO /                                  N===COH—CH—CH₂\
O α                                           α                     >O
|↗  N===COH—CH—CH₂\                           ↑      N===COH—CH—CH₂/
|   |       |        O                                |      |
CH₂—CH—COH=N          \CH₂—CH-COH=⁞=N
                                                             ↓
                                                             γ
```

III. Keratintypus.

Pepsinfest; d. h. keine α-, β- und δ-Bindungen.

Trypsinfest; d. h. die peptidischen γ-Bindungen sind blockiert, aber nicht durch β-Bindung. Wahrscheinlich wird die Bindung zwischen zwei peptidischen Gruppen durch das Stickstoffatom vermittelt.

```
                    —CO—NH        und        ←C(OH)=N
                        |                            ↓
geben
                                          —CO—N—C=⁞ ⁞=N       + H₂O
                                              ↓         ↓
                                       η      N    CH·CH₂R
                                       ↑      ||   |
        R·H₂C—CH—CO—N——————————⁞ C          CO
               |        |              |     |
               N——CO—CH·CH₂R          CH₂—N
               |                              |
RCH₂·CH—C=N                     N===C—CH·CH₂R
     |      |          η             |       |
     N—CO—CH₂         ↑    CH₃·CH—C=N
     |________________⁞__________|
```

Außer dieser Bindungsart, die wir als η-Bindung bezeichnen wollen, können noch zwei Arten existieren, das Stickstoffatom kann sich nämlich entweder an das Carboxyl oder an das Hydroxyl der Seitenketten anschließen.

Man gelangt dann zu folgenden Strukturbildern.

Die Bindung zwischen

```
—CO—NH      und   HO·CH₂—CH—CO—
     |                   |
   —CH₂                  NH
```

gibt

```
—CO—N—CH₂—CH—CO—
    |     |
  —CH     NH
```

(ν-Bindung)

Die Bindung zwischen

```
—CO—NH      und   HOOC—CH—CO—
     |                 |
   —CH₂                NH—
```

gibt

```
—CO—N—OC—CH—CO—
    |     |
  —CH₂    NH
```

(μ-Bindung)

Vier Peptinringe können also folgendermaßen vereinigt werden:

```
 ┌──────────────────────────┐
 N———CH—CH₂—N———CH—CH₂
 |    |           |    |
 CO   CO          CC   CO
 |    |           |    |
 CH-N——CH₂——CH-N—————————┐
 |                        |
 N——CO—CH—CH₂—N——CO—CH—CH₂
 |      |           |     |
CH₂.CH—CO—N - CH₂—CH—CO · N
└─────────────────────────┘
```

(ν-Bindung)

oder:

```
 ┌──────────────────────────┐
 N- -CH—CO—N- - CH—CO
 |    |          |    |
 CO   O          CO   CO
 |    |          |    |
 CH—N    CO—CH—N—————————┐
 |                        |
 N——CO—CH—CO—N—- CO—CH · CO
 |      |          |      |
CO.CH—CO- - N—CO——CH—CO—N
└─────────────────────────┘
```

(μ-Bindung)

Man kann sich auch eine Reihe von Mischformen mit verschieden zahlreichen γ- und μ-Bindungen und mit verschieden langen Seitenketten vorstellen. Die γ-und μ-Bindungen sind trypsin- und pepsinfest.

IV. Peptontypus.

Pepsinfest; d. h. keine α-, β- und δ-Bindungen vorhanden.

Trypsinlabil; d. h. die γ-Bindungen nicht blockiert.

Eine Verkettung von Peptinringen ist nur mit Hilfe eines Methylengliedes möglich; beide Glieder der Peptidbindung müssen frei vorliegen.

Man erhält dann ein Molekül von folgender Struktur:

```
N===C(OH)—CH—CH₂—CH—COH=N
|         |       |     |
CH—COH===N        N===COH—CH
|                          |
CH₂                        CH₂  (ψ-Bindung)
|                          |
CH—COH=N          N===COH=CH
|       |         |        |
N===COH—CH—CH₂————CH—COH=N
```

Diese Bindung kann vielleicht durch folgende Kondensation reproduziert werden:

```
N===COH—CH₂         HCO—CH—COH=N
|        |     +        |      |        →
CH₂—COH=N               N===COH—CH₂

     N===COH—C=CH—CH—COH=NH
→    |        |    |      |
     CH₂—COH=N     N===COH—CH₂

     N===COH—CH—CH₂—CH—COH=N
→    |        |      |      |
     CH₂—COH=N       N===COH—CH₂
```

Die Kondensation des Peptins mit Peptinaldehyd könnte der Reaktion von *Sasaki* mit aromatischen Aldehyden analog verlaufen.

Über die erepsinlabilen und erepsinfesten Bindungen im Eiweißmolekül bzw. im Antipeptonkomplex sind wir nur so weit unterrichtet, daß sie höchstwahrscheinlich zyklisch gebaute Peptidgruppen verketten, und daß dabei die Glieder von Diaminomonocarbonsäuren und Aminopolycarbonsäuren eine gewisse Rolle spielen.

Die Anwendung der oben entwickelten Methode, die auf *der spezifischen Einwirkung von Fermenten auf derartige Molekülverbände beruht*, scheint für Untersuchungen auf dem Gebiet der Eiweißkonstitution größere Dienste leisten zu können.

Über den Gaswechsel im Anfangsstadium der B-Avitaminose bei Vögeln.

Von

B. A. Lawrow und S. N. Matzko.

(Aus dem Institut für Ernährungsphysiologie des Volksgesundheitskommissariats in Moskau.)

(Eingegangen am 9. Oktober 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Untersuchungen über die Änderung von Oxydationsprozessen im Organismus beim Auftreten verschiedener Avitaminoseformen sind sehr zahlreich, und einige Forscher halten es bereits für erwiesen, daß die Herabsetzung der oxydativen Funktionen des Organismus für die Erscheinung der Avitaminose charakteristisch ist.

Diese These findet man öfters nicht nur in der Fachliteratur, sondern sogar in Lehrbüchern angeführt, so daß sie sehr leicht zu einem Dogma werden kann, wodurch allerdings das Avitaminoseproblem kaum jemals zu lösen ist.

Es liegen jedoch in der europäischen und amerikanischen Literatur eine Reihe von Untersuchungen vor, in denen ein anderer Gesichtspunkt maßgebend ist, daß nämlich beim Eintritt der Avitaminose die Oxydationsfähigkeit nicht abnimmt und der Gaswechsel nicht erniedrigt wird. Das spätere Absinken wird nur als Folge der Erschöpfung des Organismus, die immer in größerem oder kleinerem Maße bei Avitaminose auftritt, betrachtet.

Indessen können die Tatsachen, die den Vorstellungen über diese oder jene Art der Veränderungen der Oxydationsprozesse bei Avitaminose zugrunde liegen, nicht immer in der Weise erklärt werden, wie es von manchen Autoren gehandhabt wird. Überhaupt ist der Umfang der Untersuchungen in dieser Beziehung bisher noch allzu gering: sowohl nach der Anzahl der ausgeführten Arbeiten, als auch nach der Genauigkeit und Tadellosigkeit der Versuchsanordnung und der angewandten Untersuchungsmethoden. Viele Arbeiten über den

Gaswechsel bei Avitaminose, selbst die systematisch durchgeführten, erwecken den Eindruck einer nur vorläufigen, oberflächlichen Erforschung dieser Fragen.

Die Ansicht, daß die B-Avitaminose eine Zustandsform des Organismus ist, bei der die Respirationsfunktionen herabgesetzt sind, wird unseres Erachtens einerseits von *Abderhalden*, und andererseits von der *Bickel*schen Schule vertreten. *Abderhaldens* Thesen zu dieser Frage sind folgende: 1. Der Gaswechsel in vivo bei Tieren ist bei Vitamin „B"-Mangel erniedrigt; 2. die Körpertemperatur sinkt bei diesen Bedingungen; 3. die Gewebe avitaminöser Tiere verbrauchen bedeutend weniger O_2 als die Gewebe gesunder Tiere ceteris paribus.

Die erste These wird von *Abderhalden* hauptsächlich in seinen Arbeiten (1) (2) mit Tauben, die sich unter den Bedingungen einer entstehenden Polyneuritis befanden, entwickelt. Der Autor untersuchte mit Hilfe der *Haldane*schen Methode[1]) bei einer Reihe solcher Tauben täglich die CO_2-Ausscheidung mit seltenen Unterbrechungen fast bis zum Tode des Versuchstieres. Soweit sich aus der beschriebenen Methodik ersehen läßt, wurde jeder Respirationsversuch mit einer einzelnen Taube im Laufe des Tages in eine Reihe von 30 Minuten dauernden Seancen eingeteilt, und während dieser kurzen Zeiträume wurde gravimetrisch die CO_2-Menge (pro Kilogramm und Stunde) bestimmt. Die auf diese Weise für jeden Tag erhaltenen Kurven der CO_2-Ausscheidung werden vom Autor miteinander verglichen. Auf S. 87 (1) können wir bei dem Verfasser eine Wertung seiner Versuche lesen:

„Betrachtet man die Versuchsergebnisse, ... dann erkennt man ohne weiteres, daß *während der ausschließlichen Ernährung mit geschliffenem Reis der Gasstoffwechsel mehr und mehr sinkt*" (Kursiv vom Verfasser).

Wir sind mit dem Autor darin einer Meinung, daß besonders belehrend der Versuch mit der Taube Nr. 3 [S. 164 (2)] infolge seiner Dauer (78 Tage) ist [wir fügen unsererseits hinzu, daß für diese Taube eine Tabelle (Abb. 25, S. 173, ibid.) der von ihr verzehrten Nahrung angegeben ist] und wollen unsere Aufmerksamkeit diesem Objekt zuwenden. Leider gibt der Autor für seine Taube den Gaswechsel im *normalen Zustande* nicht an, so daß wir bei der Betrachtung seiner Kurven dieselben, wie es auch der Autor getan hat, nur miteinander vergleichen können. Aber außerdem haben wir die durch verschiedene Kurven dargestellte CO_2-Produktion mit derjenigen während der Hungerperiode (8 Tage), die der avitaminösen Ernährung voranging, verglichen. Für diese Hungerperiode sind fünf Kurven gegeben [(2) Abb. 14] von welchen zwei, für den zweiten und dritten Hungertag (5. und 6. April), ungefähr auf dem Niveau der Ordinate 1,7 (Gramm CO_2 pro Kilogramm und Stunde) anfangen und dann, im Auseinandergehen, Schwankungen von etwa 2,3 bis zu 1,5 geben. (Wir wollen den von diesen Kurven umfaßten Raum das „obere Feld" der Kurven des Hungerstoffwechsels nennen.) Die drei übrigen Kurven, die sich auf den vierten, fünften und sechsten Hungertag beziehen (7., 8. und 9. April), ordnen sich zwischen das Niveau der Ordinaten etwa 1 und 1,5 (das „untere Feld" der Kurven des Hungerstoffwechsels). Da alle Abbildungen für die

[1]) Nach der Modifikation von *A. Weil* (3).

Respirationsversuche mit der Taube Nr. 3 vom Autor in ein und demselben Maßstabe gegeben worden sind, so ist leicht zu ersehen, daß die Kurven der CO_2-Ausscheidung in den nach dem Hungern folgenden Tagen (Abb. 15) der avitaminösen Ernährung (geschliffener Reis) meistenteils im „oberen Felde" der Kurven des Hungerstoffwechsels sich befanden: d. h., daß sie mit den Schwankungen des Gaswechsels in den ersten Tagen des Hungers (zweiter und dritter Tag) zusammenfallen. Daraus könnte man, nach unserer Ansicht, den Schluß ziehen, daß in den ersten Tagen der avitaminösen Ernährung bei einer großen Menge Kohlehydrate *eine Erhöhung der CO_2-Produktion eintritt, wobei letztere dem am zweiten und dritten Tage des Hungers (d. h. 5. und 6. April)* beobachtetem Zustande vollständig entspricht.

Wenn wir jetzt zur folgenden Abbildung übergehen (Abb. 16), so sehen wir, daß die erste Kurve (18. April) eine weitere Erhöhung der CO_2-Produktion zeigt (Schwankungen von 2,15 bis zu 2,75!), dafür nähern sich aber die letzten zwei (21. und 22. April) dem „unteren Felde" der Hungerkurven. Es ist augenscheinlich, daß vom 21. April an die CO_2-Produktion aus irgendeinem Grunde zu sinken anfängt. Dieses niedrige Niveau wird auch an den folgenden Tagen des Versuchs festgestellt (Abb. 17), als alle Kurven, zusammen mit den erwähnten Kurven vom 21. und 22. April, im „unteren Felde" des Hungers liegen. Was ist nun die Ursache der Erhöhung der CO_2-Produktion in den ersten Tagen der avitaminösen Ernährung und ihres späteren Sinkens bis zum Hungerniveau? Die Erklärung gibt uns die Kurve der Nahrungsaufnahme. Es erweist sich, daß die CO_2-Erhöhung mit der genügenden Nahrungseinnahme, bis zu 20 g pro die (und am ersten Tage sogar 45 g!) zusammentrifft, und gerade vom 21. April an zeigt sich eine Appetitverminderung, die manchmal an völliges Hungern grenzt. Weil sich an einem solchen Tage die Symptome der Avitaminose zeigen, wird dem Versuchstiere ein Hefepräparat gegeben, wodurch der Appetit ein wenig steigt. Im Zusammenhang damit steigt auch die CO_2-Ausscheidung etwas, aber nur auf kurze Zeit, und tritt dann wieder, gleichzeitig mit dem Sinken des Appetits, in das Gebiet des „unteren Feldes" (Abb. 18, 19). Die Darreichung von Hefepräparaten am 12. und 13. Mai erhöht wieder den Gaswechsel, was wahrscheinlich auch mit der Steigerung des Appetits während dieser Tage zusammenhängt. Jedoch nimmt die CO_2-Produktion nur unbedeutend zu, denn, wenn man nicht den ausschließlichen und kurzdauernden Schwung der Kurve am 13. Mai beachtet, sind die übrigen Kurven im Gebiete des „oberen Feldes" des Hungers; und als später der Appetit wieder verschwindet, sinkt auch wieder die CO_2-Produktion und die Kurven kehren wieder ins „untere Feld" des Hungers zurück.

Wenn also bei Avitaminose der Appetit sinkt, so erniedrigt sich auch der Gaswechsel; die Einführung einiger den Appetit anregenden Substanzen ruft eine Erhöhung der CO_2-Ausscheidung hervor. Wir konnten daher keine Herabsetzung der Oxydationsfähigkeit des Organismus beim Auftreten der B-Avitaminose wahrnehmen. Es läßt sich unseres Erachtens der Schluß ziehen, daß eine direkte Wirkung der B-Avitaminose auf den Gaswechsel bei der angegebenen Versuchsanordnung nicht zum Vorschein kommt.

Gewiß *könnte* die B-Avitaminose a priori eine Wirkung auf den Gaswechsel haben, in welcher Form jedoch, bleibt noch ungeklärt; die angegebene Methodik scheint uns noch zu ungenügend zu sein, um alle die Veränderungen zu verfolgen, welche im Gaswechsel des Organismus bei dieser Ernährung

sich abspielen. Und tatsächlich bestimmt die Methodik, mit der *Abderhalden* gearbeitet hat, eigentlich sehr genau nur die Veränderungen, die während 30 Minuten in *der Kammer* vor sich gehen und nicht die Umwandlungen, die *im Organismus* vonstatten gegangen sind. Der so kurzdauernde Versuch (20 bis 30 Minuten) ist nämlich sehr vielen für den Experimentator oft unmerklichen Zufälligkeiten unterworfen: das Erschrecken des Tieres, die Konzentrierung seiner Aufmerksamkeit auf irgend ein Objekt; die nach einer Bewegungspause entstehende Aktivitätsentwicklung, die entweder durch die Umgebung oder durch das Entstehen des Hungergefühls hervorgerufen war, usw.; dies alles kann zu Respirationsbewegungen verschiedener Frequenz und Stärke[1]) führen, was sofort auf die Zusammensetzung der Gasprobe, die mittels eines Aspirators aus der Kammer herausgesaugt wird, einwirken würde. Bei der Betrachtung der *Abderhalden*schen Kurven, die zur CO_2-Produktion gehören, fällt beim ersten Blick ihre Ungleichartigkeit auf, was auf die Unvollkommenheit der Methodik hinweist [vgl. die Versuche von *Laufberger* (4)].

Wenn wir auch mit *Abderhalden* in der Interpretation seiner Arbeiten nicht konform gehen können, so wollen wir deshalb doch nicht das Entgegengesetzte behaupten: wir wollten nur hervorheben, daß das Problem auch nach dieser Abhandlung noch nicht gelöst ist und weiterer, genauerer und *ebenso systematischer* Untersuchungen bedarf.

Die unlängst erschienene Arbeit von *Farmer* und *Redenbaugh* (5) mit Tauben, die auf verschiedener Diät (ohne Vitamine) gehalten wurden, ist im Respirationsapparat nach *Benedikt* ausgeführt worden. Jeder Versuch dauerte 3 Stunden, und das Futter wurde zwangsweise in der notwendigen Menge eingeführt. Eine derartige Versuchsanordnung läßt keine Zweifel an der genauen Stoffwechseluntersuchung übrig, leider war aber jede Taube während der Avitaminose ad maximum nur viermal untersucht worden. Es zeigt sich, daß wirklich während der Avitaminose eine Erniedrigung der Wärmeproduktion statthat: so war beim Auftreten der Krämpfe die durchschnittliche (sieben Tauben) Wärmeproduktion auf 32 Proz. unter die Norm gesunken. Jedoch geben hungrige Tauben eine noch größere Herabsetzung der Wärmeproduktion bis auf 50 Proz. der Norm (6). Es wäre sehr wichtig, mit Hilfe dieser Methode zu untersuchen, von welchem Momente an das Sinken der Wärmeproduktion anfängt und wie sich zu diesem Zeitpunkt die Nahrungsresorption verhält.

Die zweite *Abderhalden*sche These, daß für die Avitaminose das Sinken der Temperatur charakteristisch ist, findet einigen Widerspruch sowohl in den Arbeiten des Autors [z. B. (8)], als auch in den Arbeiten anderer Forscher [(5), S. 35]. Aus diesen Untersuchungen ersehen wir, daß die Temperatur des Körpers bei der Avitaminoseernährung sich wohl unbedeutend verändern *kann*, und andererseits kann auch beim Hungern (gegen den elften Tag) das Sinken der Temperatur sogar viel bedeutender sein als bei der Avitaminose.

Die dritte *Abderhalden*sche These: das Sinken des O_2-Verbrauchs der Gewebe avitaminöser Tiere (die Atmung in vitro) liegt von der eigentlichen Fragestellung weit ab, denn die Bestimmung der O_2-Absorptions-

[1]) Hierzu namentlich könnte man die Bemerkung von *Groebells* [S. 107 (14)] anführen, daß die Bestimmung des Gaswechsels beim Vogel nicht als Maß des Stoffwechsels angesehen werden könne, „weil der Vogel in seinen Luftsäcken rein mechanisch CO_2 zurückhalten kann“.

fähigkeit der in einen Brei verwandelten Gewebe und Organe kann für die Oxydationsprozesse im gesamten Organismus nicht charakteristisch sein (die humorale Wirkung und die der Nerven ist ausgeschlossen). Aber als *Vergleichsmethode* hat sie dem Autor die Möglichkeit gegeben, den Unterschied in der Gewebsatmung von Tauben festzustellen, die sich in verschiedenen Ernährungszuständen befanden. Aus den Tabellen des Verfassers (9) kann man ersehen, daß die Menge des von 1 g Muskelmasse absorbierten O_2 bei avitaminösen Tauben sehr variiert. Sie ist fast normal bei *Avitaminose ohne Anzeichen einer Erschöpfung* und weicht sehr stark von der Norm ab *bei einer Avitaminose, die zur Erschöpfung (aber ohne Krämpfeerscheinungen) geführt hat* (Gewichtsabnahme 40 Proz.). Aber auch die Muskeln von durch gewöhnlichen Hunger erschöpften Tauben geben *dasselbe Bild der Abnahme der Fähigkeit, den O_2 zu binden.* Es scheint uns, daß die Hauptursache gerade *in der Erschöpfung des Organismus* liegt, ganz gleich, ob sie durch die Avitaminose oder durch den Hunger hervorgerufen ist, und gerade für die Avitaminose, insofern sie zum Unterschied vom Hunger sich in Form von Nervenstörungen ausprägt (Polyneuritis) ist das Sinken der Sauerstoffabsorptionsfähigkeit nicht charakteristisch.

Im Zusammenhang damit scheint uns die Arbeit von *Vásárhelyi* (10) sehr interessant zu sein. Aus seinen Tabellen ist es schwer, einen Unterschied in der O_2-Absorptionsfähigkeit der Muskelgewebe (in vitro) von an Beriberi erkrankten und normalen Tauben zu ersehen. Außerdem fand der Autor in Muskelextrakten die Anwesenheit von Stoffen, welche die O_2-Absorption des Muskelgewebes sowohl normaler, als auch avitaminöser Tauben erhöhten. Diese Extrakte haben die gleiche Wirkung ungeachtet dessen, ob sie aus Muskeln normaler oder avitaminöser Tauben erhalten worden sind.

Das Bestreben, die B-Avitaminose als Veränderung der O_2-Absorptionsfähigkeit bei Geweben zu charakterisieren, hat also noch keine sicheren widerspruchslosen Beweisgründe für sich ergeben.

Von der Herabsetzung der Oxydationsfähigkeit bei B-Avitaminose wird oft in den Arbeiten der *Bickel*schen Schule gesprochen. Als Beweis für die Behauptung dieser These dienen außer den oben erwähnten Arbeiten von *Abderhalden* die eigenen Arbeiten des *Bickel*schen Instituts; besonders die Arbeiten von *Tsuji* (11) und *Asada* (12, 13).

Die Versuche von *Tsuji* sind mit einem Hunde angestellt worden, der mehr als 100 Tage auf vitaminlose Diät gesetzt war. Die Nahrung wurde dem Tiere immer in derselben Menge zwangsweise eingeführt, aber der Gaswechsel wurde *nur viermal* (am 16., 31., 38. und 110. Tage des Versuchs) im *Zuntz-Geppert*schen Apparat mit Anlegen einer Trachealkanüle nüchtern bestimmt.

Diese Methode konnte vergleichendes Material für den Gaswechsel nur unter der Bedingung ihrer öfteren Anwendung in regelmäßigen Zeitperioden geben; es scheint uns aber ganz unmöglich, irgend einen Schluß zu ziehen aus Versuchen, die *nur viermal*, vom 8. Juli an bis zum 7. Oktober, ausgeführt wurden, ohne davon zu sprechen, daß ein 10 Minuten dauernder Versuch über den O_2-Verbrauch vielen Zufälligkeiten unterworfen ist und noch weniger Zutrauen verdient als die kurzdauernden Versuche der CO_2-Bestimmung im Apparat von *Weil* (siehe oben). Das Resultat der O_2-

Bestimmung bei dem Hunde dieses Forschers bestätigt unsere Auffassung in kategorischer Weise. Wenn wir den O_2-Verbrauch mit den anderen Ergebnissen des Versuchs verglichen, so sehen wir, daß bei ziemlich gutem Zustande des Tieres, vom 5. Juli an bis zum 27. Juli, als das Gewicht nur um 5 Proz. gesunken und das Stickstoffgleichgewicht eben erreicht ist, der O_2-Verbrauch von 7,28 bis auf 6 (auf 1 kg in einer Zeiteinheit) sinkt; 72 Tage später, *als die Erschöpfung schon 33 Proz. erreicht hat*, 18 *Tage vor dem Tode*, als der Organismus des Tieres schon stark gelitten hat (die infolge geschädigter Nierenfunktion N-Retention ist schon eingetreten), bleibt der O_2-Verbrauch dennoch auf *derselben Höhe, 5,76*. Die Unmöglichkeit einer derartigen Erscheinung scheint uns ganz offensichtlich zu sein, deshalb können wir die Resultate der Respirationsversuche dieses Forschers für die Charakteristik der B-Avitaminose nicht benutzen. Aus demselben Grunde können wir auch nicht die Ergebnisse der etwas später erschienenen Arbeit von *Asada* (12) mit einem Hunde gebrauchen.

Außerdem ist von *Asada* (13) eine Arbeit mit Ratten bei avitaminöser Ernährung ausgeführt worden; die Respirationsversuche wurden im Apparat von *Haldane*, mit der Modifikation von *Arnoldi*, angestellt; dabei wurde die *gravimetrische* Bestimmung der von dem Tiere ausgeschiedenen CO_2 und H_2O durch eine *graphische* ersetzt. Obgleich die Versuche nicht kurzdauernd waren (meist viele Stunden), so werden sich doch die unvermeidlichen Fehler bei der Bestimmung des absorbierten Wassers (welche bei der Anwendung dieser Methodik ohne spezielle Einrichtung allgemein üblich sind) und die möglichen Fehler bei der Umrechnung der graphischen Aufzeichnungen auf Gewichtszahlen summieren. Die fehlenden Angaben der Schwankungen im O_2-Verbrauch, die *bei der normalen Ernährung des Tieres* während derselben Zeit (2 bis 3 Wochen) beobachtet wurden, gestatten uns nicht, in gebührender Weise die Ergebnisse dieser Arbeit einzuschätzen. Zudem ist auch die Menge der zwischen den Versuchstagen verzehrten Nahrung unbekannt.

Wenn man die Arbeiten über den Gaswechsel bei der B-Avitaminose übersieht, so ist es unmöglich, die Arbeiten *Groebells'* außer acht zu lassen (14, 15, 16). Dieser Autor, der Respirationsversuche von 15 Minuten Dauer in *Kestners* Apparat anstellte, beobachtete bei Mäusen eine Erhöhung des O_2-Verbrauchs jedesmal dann, wenn das Tier von Hafer (vollwertige Nahrung) auf avitaminöse Nahrung (Reismehl) gebracht wurde. Einen gleichen Schwung nach oben sehen wir aber auch bei den Kurven der O_2-Einnahme bei Überführung der Tiere von Hafer auf Reis und Hefe [Kurve 13, S. 225 (15)]. Dieser Umstand läßt uns daran denken, als Ursache der O_2-Verbrauchserhöhung könnte die während dieser Tage überflüssige Einnahme von Nahrung dienen, einer Nahrung, die eine große Menge Kohlehydrate in leicht verdaulicher Form enthält (Reismehl im Vergleich mit dem cellulosereichen Hafer). Dieser Erklärung entspricht auch die Zunahme des Tiergewichts. Deshalb scheint es uns auch begreiflich, im Zusammenhang mit der Eigenschaft des B-Vitamins, den Appetit anzuregen, daß die von dem Autor beobachtete *Erhöhung der O_2-Einnahme mehr oder weniger schnell bei Abwesenheit von Vitamin verschwindet*

[die Kurven sinken, s. die Kurven 2 bis 4, S. 113 bis 115 (14)] *und lange Zeit anhält, wenn Vitamin verabreicht wird* [Kurve 13, S. 225 (15)].

Übrigens geben solche kurzdauernden Respirationsversuche und das Fehlen von Angaben über die Menge der verzehrten Nahrung sehr wenig Hoffnung, ein hinreichend überzeugendes Material zum Studium aller Einzelheiten des Stoffwechsels während der Entwicklung der Avitaminose zu erhalten. Es wirkt auf uns deshalb gar nicht überraschend, daß wir in den Kurven *Groebells'* nicht immer mit überzeugender Klarheit das ersehen können, was der Autor der These *Abderhalden's* (s. oben) bei der Charakteristik der B-Avitaminose gegenüberstellen will.

Im Widerspruch zu diesen Ansichten, nach denen das B-Vitamin in diesem oder jenem Sinne auf die Höhe des Gaswechsels einwirkt, kann man die unlängst erschienene Mitteilung von *Deuel*, *Harry* und *Weiss* (17) anführen.

Die Autoren arbeiteten mit dem Respirationskalorimeter und stellten mit einem Hunde bei avitaminöser Ernährung ein allmähliches Sinken der Grundwärmeproduktion fest, entsprechend der verminderten Nahrungsaufnahme und der Körpergewichtsabnahme. Es ist besonders interessant, daß am Tage vor dem Auftreten der Polyneuritissymptome und an den vier der Genesung des Tieres (vermittels Darreichung eines Hefepräparats) folgenden Tagen der Grundwechsel sich *gleich* erwies; während der Polyneuritis war aber der Grundwechsel größer als in der Norm, was im Zusammenhang mit dem in dieser Zeit erhöhten Muskeltonus stehen sollte. Daraus könnte man den Schluß ziehen, daß das B-Vitamin *unmittelbar* auf die Wärmeproduktion nicht einwirkt, worauf auch die Versuche der Autoren mit überschüssigem Einführen des B-Vitamins hinweisen, wobei keine Erhöhung des Grundwechsels festgestellt worden war. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch *Gulick* (18), in dessen Versuchen Ratten in der Unterernährung sich hinsichtlich des Grundumsatzes, sowohl *mit Vitamin als auch ohne Vitamin*, gleich verhielten. Ferner sehen wir dasselbe auch in der Untersuchung von *Mitchell* und *Carman* (19) mit Ratten, wo die erhöhten Zugaben des Vitamins zur Nahrung keine Wirkung auf den Stoffwechsel haben.

Die Ansicht, daß die B-Avitaminose ein Zustand ist, bei dem die Oxydationsfähigkeit des Organismus erniedrigt ist, bringt einige Forscher, im Zusammenhang mit der Veränderung des Zuckergehalts im avitaminösen Blut, zu der Vorstellung, daß sich dabei die verminderte Oxydationsfähigkeit hauptsächlich auf Kohlehydrate bezieht.

So stellt *Bickel* (20) der Oxydierbarkeit der Kohlehydrate diejenige der Fette und Eiweißstoffe entgegen. Jedoch scheinen dieser Behauptung die Versuche von *Mittil* (21) und von *Garstenberger* und *Burhans* (22) zu widersprechen. Der erste Forscher beobachtete bei Ratten, welche Vitamin B nicht bekamen, sogar bei Gewichtsabnahme bis auf 40 Proz., 1½ bis 3 Stunden nach der zwangsweisen Einführung (per os) von Glucose, eine Erhöhung des Respirationskoeffizienten bis auf 0,96 und 1,0. (Der Grundrespirationskoeffizient bei normalen und avitaminösen Ratten war ein gleicher, 0,755 und 0,745.)

Die angeführte Übersicht der Arbeiten über den Stoffwechsel bei B-Avitaminose — eine durchaus nicht vollständige Übersicht — gibt uns das Recht zu behaupten, daß es bis jetzt noch verfrüht ist, allgemeine Sätze für die Charakteristik dieser Avitaminose festzustellen: Es sind noch zu viel Widersprüche vorhanden, die infolge der verschiedenen Genauigkeit bei der Anstellung der Versuche und der angewandten Untersuchungsmethoden bei verschiedenen Forschern entstanden sind. Viele Arbeiten können wir jetzt schon als orientierende ansehen, und ohne Zweifel ist die Zeit gekommen, den avitaminösen Zustand des Tieres von allen Seiten aus und mit Anwendung genauer, „klassischer“ Methoden, ohne ihre Umständlichkeit und Schwierigkeit zu fürchten, zu untersuchen. Wir sehen diese Richtung in verschiedenen Ländern; denselben Weg hat auch unser Institut schon seit einigen Jahren bei der Untersuchung der Avitaminose beschritten. Eine der Arbeiten dieser Richtung, die von uns ausgeführt wurde und die gewiß nur einen Beitrag zur Avitaminosefrage liefert, wird weiter unten vorgelegt (*B. Lawrow*).

Experimenteller Teil.

Die vorliegende Arbeit wurde zwecks Untersuchung des Gasstoffwechsels im Anfangsstadium der B-Avitaminose bei Vögeln unternommen. Sie wurde mit zwei erwachsenen Hühnern ausgeführt, bei einseitiger Ernährung derselben mit Futter, welches praktisch den Faktor „B“ nicht enthielt. Zum Vergleich werden anfänglich beide Versuchstiere mit einer vollkommen genügenden Ration (Buchweizen und Hafer) gemästet und der Gaswechsel während dieser Mastperiode sowie der darauf folgenden Avitaminoseperiode studiert.

Jedes Versuchstier befand sich in einem großen (1 × 1 m) Drahtkäfig, der von oben und an den gegen die Wand gerichteten Seiten durch Papier vor dem Eindringen von Schmutz (Kalk) geschützt war. Der Käfigboden war mit einer reinen Furnierplatte bedeckt.

Täglich zu bestimmter Stunde, vor der ersten Fütterung, wurde der Vogel aus dem Käfig auf einen Tisch gebracht, wo das Futter unter besonderen Vorkehrungen gegen ein Verstreuen verabreicht wurde, wobei das Gewicht des verabreichten Futters sorgfältig kontrolliert wurde.

Falls der Vogel das Futter nicht gutwillig fressen wollte, wurde eine erforderliche Menge durch zwangsweises Einführen in den Schnabel eingegeben.

Wir hielten es für notwendig, den Gaswechsel möglichst oft zu untersuchen, um die Veränderungen der Oxydationsfähigkeit des Organismus, je nach der Entwicklung der Avitaminose, feststellen zu können. Zu diesen Experimenten benutzen wir den *Schaternikoff*schen Respirationsapparat (23). Das Kammervolumen (Tierbehälter) betrug etwa 0,25 cbm.

Da wir die Absicht hatten, gleichzeitig auch den Stickstoffumsatz zu untersuchen (die Resultate werden später veröffentlicht werden), so konnten wir die Respirationsversuche nicht in gewohnter Weise an den Tieren vornehmen, die zunächst 16 Stunden sowie während des Versuchs selbst

gehungert hatten, weil dann selbstverständlich auch der Verlauf des Stickstoffwechsels stark verändert worden wäre.

Infolgedessen waren wir gezwungen, vom Studium des sogenannten „Grundumsatzes" abzusehen, wir versuchten nur, stets streng einheitliche Bedingungen bei der Ausführung der Versuche innezuhalten. Vor dem Respirationsversuch selbst wurden die Tiere mit der halben Tagesration gefüttert. Die Dauer des Gaswechselversuchs betrug meistens 10 bis 9 Stunden, wobei die Vögel gewöhnlich bewegungslos im Apparat saßen und selten von dem ihnen hingestellten Wasser tranken.

Die Versuchsresultate sind in den Tabellen I, II, III und in den Abb. 1, 2 und 3 wiedergegeben, wobei in den letzteren die Gewichtsschwankungen in Prozenten zum Gewicht des ersten Tages, das in den Abbildungen angeführt ist, ausgedrückt sind.

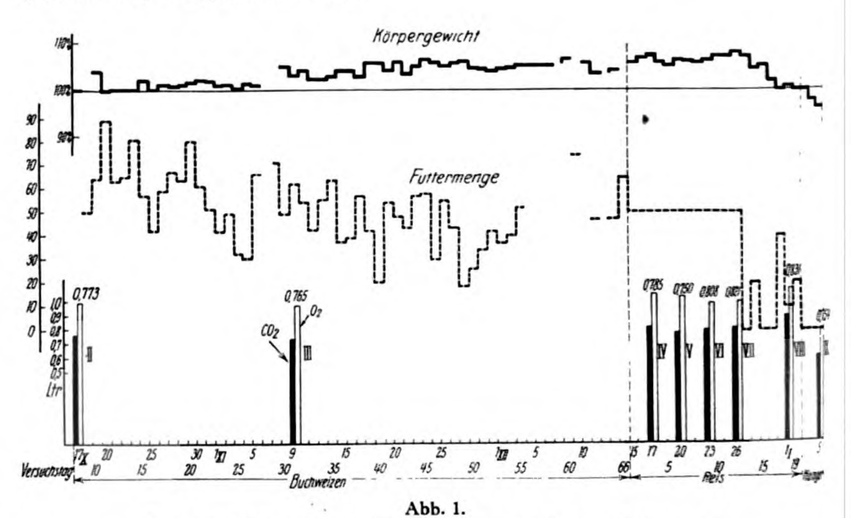


Abb. 1.
Die erste Linie = Körpergewicht. Die zweite Linie = Futtermenge.
Die schwarzen Säulchen = CO_2, die weißen Säulchen = O_2 (Liter pro Kilostunde).
Die Zahlen über den Säulchen = R.-Q.

Die *erste Untersuchung* wurde am Huhn 1 vorgenommen, welches Buchweizen ad libitum im Laufe von 66 Tagen (10. Oktober bis 14. Dezember) erhielt, wobei das Gewicht anfangs abnahm, von 1485 auf 1400 g (20. bis 25. Oktober), später wieder zunahm bis auf 1480 g (18. November) und mehr und alsdann im Bereich einiger Prozente schwankte. Die Schwankungen der Futterquantitäten sind aus der Abb. 1 (punktiert) leicht ersichtlich. Am 15. Dezember 1925 erhielt der Vogel 50 g polierten Reis, wovon er schon nach 3 Tagen gutwillig nur 20 bis 30 g genoß, die restliche Menge mußte ihm in kleinen Portionen durch den Schnabel zwangsweise eingeführt werden. Die Reisdiät dauerte 12 Tage (bis zum 26. Dezember 1925), wobei schon am siebenten Tage (21. Dezember 1925) der Vogel das Futter vollständig verweigerte und die gesamte Tagesportion zwangsweise eingeführt werden mußte.

Vom achten Tage an entleerte sich der Kropf schlecht und am 13. Tage (27. Dezember 1925) morgens war der Kropf so voll, daß kein Futter mehr

Tabelle I.

Huhn 1 (erste Untersuchung).

Nr. des Versuchs	Datum 1925	Gewicht vor dem Versuch g	Futter g	Tag der Fütterung	Quantum des verabreichten Futters vor dem Respirationsversuch g	Dauer des Respirationsversuchs	Volumen auf 1 kg pro Stunde (0° und 760 mm) O_2 Liter	CO_2 Liter	R.-Q.	Bemerkungen
2	17. X.	1404	Buchweizen	8.	20	12h25'	0,990	0,765	0,773	
3	9. XI.	1445		31.	50	10 30	0,958	0,732	0,765	
4	17. XII.	1507	Reis	3.	20	10 00	1,050	0,824	0,785	
5	20. XII.	1493	„	6.	20	10 40	1,033	0,775	0,750	
6	23. XII.	1489	„	9.	20	10 39	0,990	0,800	0,808	Symptome von Avitaminose: voller Kropf, Appetitlosigkeit Tags zuvor 40 g Reis; vor dem Versuch voller Kropf
7	26. XII.	1514	„	12.	20	10 12	0,994	0,817	0,821	
	1926									
8	1. I.	1413	„	18.	—	8 00	1,082	0,900	0,831	
9	5. I.	1349	Hunger	—	—	10 06	0,807	0,610	0,754	Dritter Hungertag

Tabelle II.

Huhn 2 (zweite Untersuchung).

Nr. des Versuchs	Datum	Gewicht vor dem Versuch g	Futter g	Tag der Fütterung	Quantum des verabreichten Futters vor dem Respirationsversuch g	Dauer des Respirationsversuchs	O_2 Liter	CO_2 Liter	R.-Q.	Bemerkungen
1	2. II.	1463	Buchweizen	15.	30	9h00'	0,774	0,782	1,010	
2	6. II.	1474	Hafer	2.	11	9 00	0,715	0,587	0,820	
3	12. II.	1503	„	8.	30	11 25	0,628	0,624	0,994	
4	16. II.	1519	Reis	4.	30	10 10	0,757	0,608	0,803	

Tabelle III.

Huhn 2 (dritte Untersuchung).

Nr. des Versuchs	Datum	Gewicht vor dem Versuch g	Futter g	Tag der Fütterung	Quantum des verabreichten Futters vor dem Respirationsversuch g	Dauer des Respirationsversuchs	O_2 Liter	CO_2 Liter	R.-Q.	Bemerkungen
2	14. IV.	1546	Hafer + Stärke	22.	25	9h09'	0,706	0,609	0,862	
3	19. IV.	1573	Reis	2.	25	9 34	0,680	0,807	1,190	
4	22. IV.	1581	„	5.	25	8 33	0,931	1,066	1,146	23. IV. die ersten Erscheinungen von Avitaminose: Gewichtsabnahme, Schwäche, ungenügende Kropfentleerung
5	26. IV.	1545	„	9.	25	8 42	0,809	0,943	1,166	

eingegeben werden konnte. Am nächsten Morgen spürte man noch einige Körner im Kropf und es wurde dem Vogel Reisgrütze verabreicht (aus 20 g trockenem Reis). Am 15. und 16. Tage erhielt der Vogel kein Futter. Am 17. Tage (31. Dezember 1925) war der Kropf leer und der Vogel erhielt wieder 40 g Reis. An den darauf folgenden Tagen wurden dem Vogel nur 10 bis 20 g eingeführt, weil sich der Kropf nicht entleerte (1. und 2. Januar 1926) und vom 3. Januar 1926 (20. Tag) an hörte die Fütterung auf.

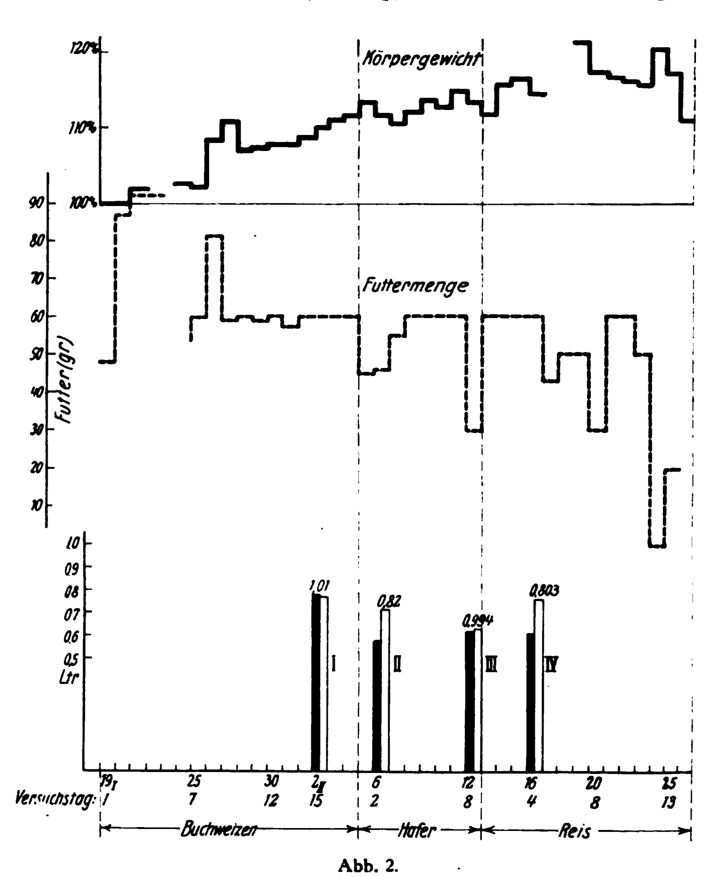


Abb. 2.
Die erste Linie = Körpergewicht. Die zweite Linie = Futtermenge.
Die schwarzen Säulchen = CO_2, die weißen Säulchen = O_2 (Liter pro Kilostunde).
Die Zahlen über den Säulchen = R.-Q.

Diese Notiz des Tagebuchs weist darauf hin, daß der Vogel schon gegen den siebenten Tag der Reisfütterung Appetitlosigkeit zeigte, sowie vom neunten Tage an Veränderungen der motorischen Funktionen des Darmkanals (aller Wahrscheinlichkeit nach nicht nur solcher allein) aufwies. Diese Veränderungen steigerten sich fernerhin immer mehr und mehr und zeigten das gewöhnliche Bild des Anfangsstadiums der Avitaminose bei Vögeln (Kropflähmung). Im weiteren Verlauf gesellt sich zur Avitaminose der Hunger, was aus der schnellen Gewichtsabnahme des Tieres

leicht ersichtlich ist. Aus Tabelle I und Abb. 1 läßt sich erkennen, daß bei der Fütterung mit Buchweizen, sowie mit Reis, bei den ersten Erscheinungen von Avitaminose (Versuch 11, 12) und sogar am ersten Hungertage (Versuch 13) das verbrauchte Quantum O_2 pro Kilogramm und Stunde nur geringe Schwankungen aufweist, ungefähr 1 Liter (17. Oktober 1925 0,990 Liter, 1. Januar 1926 1,082 Liter). Bei weiterem Hungern sinkt selbstredend der O_2-Verbrauch bis auf 0,807 Liter (5. Januar 1926).

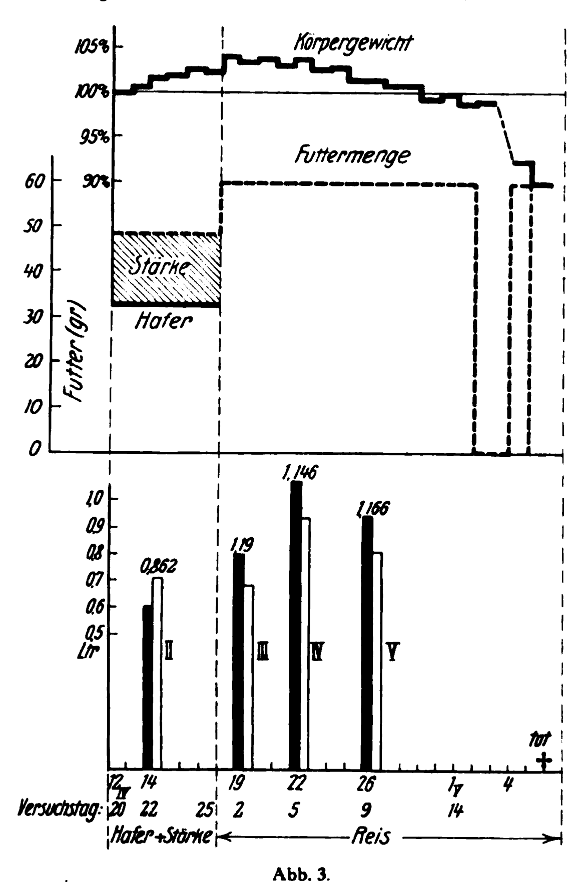


Abb. 3.
Die erste Linie = Körpergewicht. Die zweite Linie = Futtermenge.
Die schwarzen Säulchen = CO_2, die weißen Säulchen = O_2 (Liter pro Kilostunde).
Die Zahlen über den Säulchen = R.-Q.

Dasselbe gilt auch für die CO_2; das Quantum derselben steigert sich sogar bei den Anfangserscheinungen der Avitaminose, und erst bei der Hungerdiät sinkt die Erzeugung von CO_2 bis auf 0,61 Liter.

Für die *zweite Untersuchung* benutzten wir das Huhn 2, welches erst mit Buchweizen im Laufe von 17 Tagen, sodann mit Hafer im Laufe von 7 Tagen gemästet wurde; erst dann gingen wir zur Reisdiät über, um einen Vergleich des Gaswechsels bei verschiedenen Futtersorten und den verschiedenen Stadien der Mästung ziehen zu können.

Während dieser Untersuchungsperiode erhielt das Tier, sozusagen, gemischtes Futter: erst Buchweizen, dann Hafer, sodann, nach verhältnismäßig kurzen Zwischenräumen, Reis, wobei der Vogel merklich an Gewicht zunimmt, der Gaswechsel jedoch sich nur wenig verändert; selbst am vierten Tage der Reisdiät machen sich keinerlei besondere Veränderungen im Vergleich mit anderen Futtersorten bemerkbar (Versuche 3 und 4, Tabelle II, Abb. 2).

Im weiteren Verlauf des Versuchs wiederholen sich dieselben Erscheinungen wie bei dem Huhn 1; am sechsten Tage der Reisdiät mußte man, wenigstens abends, das Futter zwangsweise einführen, und vom zehnten Tage an wurde eine unvollständige Entleerung des Kropfes konstatiert. Das schnelle Eintreten der Kropflähmung befürchtend, unterbrachen wir den Versuch und fütterten das Huhn im Laufe eines Monats ad libitum mit Hafer.

Vom 24. März 1926 an erneuerten wir bei demselben Huhn die Registrierung der Futterquantitäten (*dritte Untersuchung*), wobei dem Vogel täglich 33 g Hafer verabfolgt wurden, was dem Stickstoffgehalt nach 60 g Reis entspricht. Das Anfangsgewicht betrug 1631 g. Jedoch erwies es sich, daß 33 g Hafer nicht genügten, und das Huhn fing an abzumagern; am 1. April sank sein Gewicht bereits auf 1519 g. Da wir beabsichtigten, fernerhin auf eine in bezug auf Stickstoff äquivalente Reisfütterung überzugehen (60 g), so fügten wir, um die Gleichartigkeit des Versuchs zu wahren, zum Hafer eine gewisse Menge Stärke hinzu, so daß Hafer + Stärke ungefähr 60 g Reis entsprachen, und zwar nicht nur hinsichtlich des Stickstoffs, sondern auch der übrigen stickstofffreien Komponenten. Die Zugabe von Stärke begann am 2. April (12 g); am 6. April betrug das Gewicht des Vogels 1544 g, sank aber zum 9. April wiederum auf 1511 g. Vom 10. April an wurde die Stärkeration bis auf 16 g vergrößert, das Gewicht des Vogels erhöht sich bis zum 17. April auf 1561 g (vgl. Abb. 3, wo das Gewicht des Vogels von 1521 g am 12. April mit 100 angenommen wird). Vom 18. April an erhielt der Vogel ausschließlich Reis (60 g), wobei sich sein Gewicht bis zum 20. April auf 1583 g steigert. Vom 21. April (vierten Tage der Reisdiät) an kann das Futter wegen vollständiger Nahrungsverweigerung nur zwangsweise eingegeben werden, und vom 23. April an beginnt das Gewicht allmählich zu sinken, morgens spürt man im Kropf meistens kleine Überreste. Am neunten Tage der Reisdiät (der Kropf ist morgens entleert) betrug das Gewicht des Vogels bereits nur 1545 g und am zwölften Tage 1521 g; obgleich sich der Kropf im Laufe dieser Tage in befriedigender Weise entleerte, ist eine *bedeutende Schwäche* des Vogels zu konstatieren. (Am 26. April, am neunten Tage während der Eingabe des Futters, wurde das Huhn ohnmächtig, was sich am 30. April wiederholte.)

Am 1. Mai (14. Tag der Reisdiät) lassen sich *rhythmische Bewegungen des Kopfes und des Halses* bemerken, die an Erbrechungsbewegungen erinnern. Nach der Fütterung an diesem Tage erhält der Hals die „Schwanen"-Verkrümmung, die gegen Abend zunimmt. Bedeutende Bewegungsträgheit, Schläfrigkeit; der Kropf ist jedoch gut entleert. Der 2. und 3. Mai sind als Hungertage vorgesehen. Am 4. Mai beträgt das Gewicht des Vogels 1407 g; es werden ihm wieder 60 g Reis verabfolgt. Der Vogel liegt auf der Seite und kann überhaupt nicht mehr stehen; die Temperatur ist stark gesunken (36,6°); komatöser Zustand; die Augen sind meistens geschlossen; er reagiert nicht auf Reizungen. Gegen Mittag ist der Hals stark nach unten ausgebogen, die Halsfedern stehen aufrecht; die Füße sind vorgestreckt; die

Zehen spreizen sich und sind in den Gelenken unbeweglich; dieselben Erscheinungen treten am nächsten Tage auf, der Kropf ist nicht entleert. Am Morgen des 6. Mai ist der Vogel tot.

Die geschilderten Symptome lassen keinem Zweifel Raum, daß sich bei dem Vogel eine typische Polyneuritis entwickelte, die in jener Periode begann, als der Vogel bei Reisdiät an Gewicht abnahm und ungenügende Kropfentleerung zu konstatieren war, d. h. vom 23. April an. Unsere Gaswechselversuche ergeben, daß zu jener Zeit, sowie einige Tage später, als das Gewicht des Vogels noch mehr sank, die Menge des verbrauchten Sauerstoffs zunimmt (bis zu 0,9 bis 0,8 Liter pro Kilostunde). Es erscheint uns äußerst interessant, daß sich zu dieser Zeit die Produktion von CO_2 in größerem Maße steigert, was eine Zunahme des Respirationskoeffizienten bis auf 1,15 bis 1,16 zur Folge hat (s. Versuche 4 und 5, Tabelle III). Man muß allerdings betonen, daß der Respirationskoeffizient auch vorher sehr hoch war, als noch keinerlei Symptome von Avitaminose zu bemerken waren (s. Versuch 3, Tabelle III) und als eine Steigerung durch Umwandlung der Kohlehydrate zu Fett zu erklären wäre. In diesem Falle wäre es aber schwer, von einer Fettablagerung im Organismus zu sprechen, in Anbetracht dessen, daß der Vogel abzumagern anfing.

Bei der Sektion des Vogels, die Herr Professor *F. P. Polowinkin* im Moskauer Zootechnischen Institut vornahm, wofür wir ihm auch hier unseren wärmsten Dank aussprechen möchten, wurde eine bedeutende Fettablagerung (makroskopisch) auf dem Herzen und in der Bauchhöhle, sowie ein gut entwickeltes Hautfettgewebe festgestellt. Somit bestätigt das Resultat der Autopsie unsere Annahme hinsichtlich einer Fettablagerung im Körper des Tieres, sowie hinsichtlich dessen, daß in unserem Falle die Avitaminose nicht mit der Erscheinung einer generellen Erschöpfung des Organismus verknüpft war. Darauf weist auch die verhältnismäßig geringe Gewichtsabnahme hin. (Am Tage vor dem Tode, nach mehreren Hungertagen, betrug das Gewicht bis 90 Proz. vom Anfangsgewicht.

Wir halten es für unsere angenehme Pflicht, Herrn Professor *M. N. Schaternikoff*, dessen Ratschläge und Hinweise wir uns stets bedienten, unseren aufrichtigsten Dank auszusprechen; desgleichen drücken wir auch Frau *Olga P. Moltschanowa* unseren Dank aus, die uns bei den Respirationsversuchen und bei der Verpflegung der Tiere stets behilflich war.

Zusammenfassung.

1. An zwei Hühnern wurde ein Vergleich des Gaswechsels bei Ernährung mit vollwertigem Futter (Buchweizen oder Hafer) mit einem solchen bei Ernährung mit poliertem Reis bis zum Erscheinen von Avitaminosesymptomen vorgenommen. Die Gaswechselversuche wurden im *Schaternikoff*schen Apparat (nach dem Regnaultprinzip) ausgeführt und dauerten 9 bis 10 Stunden. Vor den Versuchen erhielten die Tiere die halbe Tagesration.

2. Tabelle I und Abb. 1 illustrieren den Fall, wo nach 66tägiger Fütterung mit Buchweizen der O_2-Verbrauch pro Kilostunde derselbe bleibt wie bei der nachfolgenden Reisdiät; er bleibt auch unverändert sowohl vor als auch nach dem Erscheinen der Symptome der Avitaminose (Appetitlosigkeit, ungenügende Kropfentleerung, Versuche 6, 7 und 8). Die CO_2-Produktion *steigert sich etwas*, entsprechend der Stärkemenge im Futter, wodurch sich auch der Respirationskoeffizient erhöht. Bei andauerndem Hungern nimmt der Gaswechsel zusehends ab (Versuch 9).

3. Tabelle II und Abb. 2 charakterisieren den Fall an einem anderen Vogel: bei Ernährung mit vollwertigem Futter, Buchweizen und Hafer, ferner bei Reisfütterung von kurzer Dauer erleidet der Gaswechsel geringe Schwankungen und steht in keinem Verhältnis zur Futtersorte.

4 Tabelle III und Abb. 3 zeigen, daß bei demselben Tiere, 2 Monate später, nach Fütterung mit Hafer (33 g) und Stärke (16 g) (nach dem Stickstoffgehalt und den stickstofffreien Komponenten = 60 g Reis), sowie während einer anfänglichen Reisdiät (60 g pro Tag) der O_2-Verbrauch an die vorhergehende Periode (Tabelle II) erinnert. Sodann steigert sich derselbe im Verlauf der Reisdiät und hält sich verhältnismäßig auf derselben Höhe (Versuch 5), ungeachtet des Auftretens von Avitaminosesymptomen (Gewichtsabnahme, Schwäche und ungenügende Kropfentleerung). Gleichzeitig nimmt die CO_2-Produktion sehr bedeutend zu und hält sich auf der gleichen Höhe auch beim Erscheinen der Avitaminosesymptome (Versuch 5, Tabelle III).

Der Respirationskoeffizient ist während der ganzen Dauer der Reisdiät höher als 1.

5. Durch Sektion des Vogels, der 10 Tage nach dem ersten Auftreten der Avitaminosesymptome — akuter Halskontraktur, Kropfparalyse, Flügelparese und Krämpfen — starb, wurde eine starke Fettablagerung auf dem Herzen und in der Bauchhöhle festgestellt.

6. *Allgemeine Schlußfolgerung*: In unserem Falle steht das Auftreten der Avitaminosesymptome in keinem Verhältnis zur Herabsetzung des Oxydationsvermögens des Organismus. Das ausgesprochene Sinken des Gaswechsels bei Avitaminose tritt erst dann ein, wenn parallel auch das Hungern des Organismus einsetzt.

Literatur.

1) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. **187**, 80, 1921. — 2) *Derselbe*, ebendaselbst **192**, 163, 1921. — 3) *A. Weil*, ebendaselbst **185**, 33, 1920. — 4) *V. Laufberger*, diese Zeitschr. **158**, 261, 1925. — 5) *Ch. Farmer* und *H. Redenbaugh*, Amer. Journ. of Phys. **75**, 27, 1925. — 6) *Dieselben*, ebendaselbst **75**, 41, 1925. — 7) *F. Groebells*, H. S. **122**, 107, 1922. — 8) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. **178**.

260, 1920; **187**, 81 bis 82, 1921. — 9) *Derselbe*, ebendaselbst **185**, 144, 1920. — 10) *B. Vásárhelyi*, ebendaselbst **212**, 239, 1926. — 11) *M. Tsuji*, diese Zeitschr. **129**, 194, 1922. — 12) *K. Asada*, ebendaselbst **140**, 326, 1923. — 13) *Derselbe*, ebendaselbst **143**, 387, 1923. — 14) *F. Groebells*, H. S. **122**, 104, 1922. — 15) *Derselbe*, ebendaselbst **131**, 214, 1923. — 16) *Derselbe*, ebendaselbst **137**, 14, 1924. — 17) *J. Deuel, J. Harry* und *R. Weiss*, Proc. of soc. f. exper. biol. a. med. **21**, 456, 1924; zitiert nach Berichte ü. d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **129**, 238, 1925. — 18) *A. Gulick*, Amer. Journ. of Phys. **68**, 131, 1924. — 19) *H. Mitchell* und *G. Carman*, ebendaselbst **76**, 385, 1926. — 20) *A. Bickel*, diese Zeitschr. **146**, 493, 1924; **166**, 251, 1925. — 21) *Mittil*, Journ. of biol. Chem. **55**, 717, 1923. — 22) *Garstenberger* und *Burhans*, ebendaselbst **50**, XXXVII, 1922; zitiert nach *Mittil* (21). — 23) *M. N. Schaternikoff*, Zur Methodik der Gaswechseluntersuchungen am Menschen. Žurnal exsperimentalnsij biologii i mediciny, Jahrg. 1925, Nr. 2, S. 139 bis 147 (russisch) und deutsche Zusammenfassung, S. 148 bis 150.

Spektrophotometrische Studien an Blutfarbstoff und Derivaten.

Von

Vilma Zilzer.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Königl. ung. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 15. Oktober 1926.)

Spektrophotometrische Messungen, durch die die Konzentration einer Lösung auf Grund des bekannten Absorptionsverhältnisses (*Vierordt*) an einer bestimmten Spektralstelle ermittelt werden soll, oder spektrophotometrische Bestimmungen der Absorptionskurve eines Farbstoffs, wo infolge der verschieden starken Absorption des Lichtes an verschiedenen Spektralstellen entweder die Konzentration oder die Schichtdicke, oder aber beide gleichzeitig variiert werden müssen, können richtige Resultate nur in dem Falle liefern, wenn für die Lösung des betreffenden Stoffes das *Beer*sche Gesetz gültig ist, d. h. die Lichtabsorption, am Extinktionskoeffizienten gemessen, sowohl der Schichtdicke wie auch der Konzentration streng proportional ist. Es gibt eine Reihe von Stoffen, an denen dies bestätigt gefunden wurde, und viele andere, namentlich solche kolloider Natur, an denen es nicht der Fall ist.

In nachstehenden Mitteilungen soll gezeigt werden, daß an einigen untersuchten Stoffen offenbar kolloider Natur, die in ihrem Verhalten vom *Beer*schen Gesetz abweichen, bezüglich dieser Abweichung dennoch gewisse Gesetzmäßigkeiten bestehen, die vielleicht in der Zukunft genauer werden formuliert werden können.

Ich habe die Versuche an Oxyhämoglobin, Hämin und an Hämatoporphyrin vorgenommen, die nach den bekannten Vorschriften dargestellt wurden.

A. Methodik.

Oxyhämoglobin. Defibriniertes Pferdeblut wurde zentrifugiert, der Blutkörperchenbrei durch wiederholtes Übergießen mit physiologischer

Kochsalzlösung und nachfolgendes Zentrifugieren gewaschen, je 500 ccm Blutkörperchenbrei im Scheidetrichter mit 200 ccm Wasser und 150 ccm Äther versetzt, 12 Stunden lang stehengelassen, die klare Flüssigkeit abgegossen, von Äther durch Durchleiten von Luft befreit, abgekühlt, mit ¼ Volumen eisgekühltem Alkohol versetzt und im Kältegemisch stehen gelassen. Die nach 24 bis 48 Stunden ausgefallenen Kristalle habe ich auf der Nutsche gesammelt, mit eiskaltem Wasser gewaschen, in möglichst wenig Wasser von 37° C wieder gelöst, mit Alkohol versetzt und auf diese Weise zwei- bis dreimal umkristallisiert.

Hämin. Defibriniertes Rinderblut wurde zentrifugiert, das Zentrifugat mit demselben Volumen reinen Wassers und dem halben Volumen Äther in einem Scheidetrichter einen halben bis einen ganzen Tag lang stehen gelassen; nach Ablauf dieser Zeit wurde die untere klare Schicht durch Luftdurchleiten vom Äther befreit und in die dreifache Menge Eisessig, dem pro Liter 4,5 g Kochsalz zugesetzt waren, eingegossen, und zwar mit einer Geschwindigkeit von 300 ccm pro halbe Stunde. Zum Schluß wurde der Eisessig noch eine Viertelstunde lang in schwachem Sieden erhalten, dann binnen einer Viertelstunde mit dem halben Volumen destillierten Wassers versetzt, und nach dem Abkühlen 12 Stunden lang stehengelassen. Nach dieser Zeit hatten sich reichlich Häminkristalle abgesetzt, die nach dem Dekantieren der über ihnen stehenden Flüssigkeit wieder mit destilliertem Wasser übergossen, abfiltriert und am Filter mit destilliertem Wasser säure- und chlorfrei gewaschen und schließlich durch Waschen mit Alkohol und Äther gereinigt wurden. Behufs weiterer Reinigung wurde das Rohhämin nach *Schalfejeff*[1]) in pyridinhaltigem Chloroform gelöst, vom Ungelösten abfiltriert und das Filtrat in heißen Eisessig eingetragen, der 1 ccm konzentrierter Salzsäure in 140 ccm enthält. Die Kristallisation wurde durch Schütteln gefördert, nachher wurde 1 Tag lang stehengelassen, die Kristalle erst mit konzentriertem, dann mit verdünntem Eisessig gewaschen, der einen geringen Zusatz an Salzsäure enthielt und zum Schluß im Vakuum über festem Kaliumhydroxyd getrocknet.

Hämatoporphyrin habe ich nach dem *Fischer-* und *Willstätter*schen[2]) Verfahren dargestellt. Reines Hämin wird am 42gradigen Wasserbad unter häufigem Schütteln in Bromwasserstoffsäure-Eisessig gelöst, wobei 25 ccm der Säure auf 1 g Hämin entfallen; vom Ungelösten wird abfiltriert, das Filtrat mit Wasser auf das Sechsfache verdünnt und tropfenweise so lange mit einer konzentrierten Lösung von essigsaurem Natrium versetzt, bis die Niederschlagsbildung nicht mehr zunimmt. Der Niederschlag wird am Filter gesammelt und dort mit Wasser bromfrei gewaschen.

Von den rein dargestellten Stoffen habe ich Stammlösungen von möglichst großer Konzentration bereitet, die aber eben noch geeignet waren, in dünnster Schicht spektrophotometrisch untersucht werden zu können; diese Stammlösung habe ich weiterhin jedesmal auf das Doppelte, Vierfache usw. verdünnt. Die Konzentration der Stammlösung ergab sich am Hämin und Hämatoporphyrin aus der genau abgewogenen Substanzmenge und dem bekannten Volumen des Lösungsmittels, am Oxyhämoglobin wurde sie aus dem Extinktionskoeffizienten der Stammlösung und dem für die betreffende Spektralstelle bekannten Absorptionsverhältnis

[1]) *M. Schalfejeff*, Le physiologiste russe Moscau 1, 15. 1898; nach Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 391, 1903/04.

[2]) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 456, 1913.

(*Vierordt*) berechnet. Zur Herstellung der Lösungen und der weiteren Verdünnungen wurden von der Reichsanstalt in Charlottenburg geeichte Meßkolben und Pipetten verwendet. Die Stammlösung und alle Verdünnungen wurden eine nach der anderen hergestellt und dann erst die Ablesungen am Spektrophotometer begonnen. Oxyhämoglobin wurde in $^1/_{10}$proz. Lösung von Na_2CO_3 gelöst, Hämin teils in n/10 NaOH, teils in verdünntem Ammoniak (5 ccm konzentrierten Ammoniaks auf 1 Liter Wasser), Hämatoporphyrin teils in Alkohol, teils in n/10 KOH gelöst untersucht.

Die Bestimmungen habe ich mittels eines nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *König*schen Spektrophotometers (mit großer Beleuchtungseinrichtung) ausgeführt, das seinerzeit von *Hári*[1]) justiert und kalibriert wurde. Als Lichtquelle diente eine Metallfadenglühlampe von besonders starker Lichtintensität. Der Objektivspalt war 0,05 mm breit; der Okularspalt, dessen wirkliche Breite an diesem Apparat leider nicht genau meßbar ist, wurde stets ein für allemal unverändert belassen und umfaßte, da es sich um einen Prismenapparat handelt, verschieden breite Spektralausschnitte: in Rot war er etwa 15, in Violett etwa 5 $\mu\mu$ breit. Jede Ablesung wurde in allen vier Quadranten je dreimal vorgenommen, und um die Fehler, die von der etwa während der Ablesungen erfolgenden Änderung der Lichtintensität herrühren könnten, auszumerzen, habe ich (nach der Originalvorschrift) die Ablesungen erst bei „Lösung rechts und Lösungsmittel links", dann bei „Lösungsmittel rechts und Lösung links" vorgenommen, und zum Schluß noch einmal in der ersten Lage wiederholt. Die erste und dritte Lage lieferten in weitaus den meisten Fällen sehr gut miteinander übereinstimmende Werte, aus denen dann das Mittel gezogen wurde.

B. Vorversuche.

Bereits die ersten orientierenden Versuche haben gezeigt, daß Bestimmungen an Oxyhämoglobin, Hämin und Hämatoporphyrin an ein und derselben Lösung bei verschiedener Konzentration und bei verschiedenen Schichtdicken ausgeführt, verschiedene auf die einheitliche Konzentration reduzierte Extinktionskoeffizienten ergeben, daß demnach das *Beer*sche Gesetz für diese Lösungen nicht gilt. Um sicher zu sein, daß es sich nicht um versuchstechnische Fehler handelt, habe ich in einigen Versuchsreihen die Extinktionskoeffizienten von $KMnO_4$- und $CuSO_4$-Lösungen unter Variierung der Konzentration und der Schichtdicke bestimmt, und konnte mich davon überzeugen, daß die so erhaltenen Werte konform dem *Beer*schen Gesetz ausfielen. In den nachfolgenden Tabellen I und II ist Konzentration 1 gleich der Konzentration der Stammlösung, d = Schichtdicke in Millimetern, ε = der unmittelbar aus den Ablesungen berechnete Extinktionskoeffizient, ε_{red} = der auf die Konzentration der Stammlösung reduzierte Extinktionskoeffizient. Versuchsreihe 1 wurde bei $\lambda = 535{,}2\ \mu\mu$, alle übrigen bei $\lambda = 578{,}3\ \mu\mu$ ausgeführt. Die Versuchsreihe 1 zeigt bedeutende Schwankungen der reduzierten Werte, doch glaube

---

[1]) Diese Zeitschr. 82, 229 bis 281, 1917.

Tabelle I. $KMnO_4$.

Konz.	d	ε	$ε_{red}$
	Versuchsreihe 1.		
1	1	0,108	1,080
1	2	0,204	1,020
1	5	0,474	0,950
1	10	1,106	1,106
1/2	20	1,117	1,117
1	1	0,098	0,988
1	2	0,195	0,975
1	5	0,537	1,074
1	10	1,134	1,134
	Versuchsreihe 2.		
1	10	0,668	0,668
1/2	5	0,166	0,665
1/2	10	0,330	0,660
1/2	20	0,663	0,663
1/2	35	1,170	0,669
1/4	10	0,164	0,657
	Versuchsreihe 3.		
1	10	0,690	0,690
1/2	20	0,696	0,696
1/2	50	1,756	0,702
1/4	50	0,869	0,696
1	10	0,694	0,694
1/4	50	0,865	0,692
	Versuchsreihe 4.		
1	5	0,679	1,358
1/2	5	0,341	1,365
1/2	10	0,683	1,366
1/4	10	0,338	1,355
1/4	20	0,685	1,369
1/4	35	1,197	1,367
1/8	20	0,337	1,348
1/4	10	0,339	1,358

Konz.	d	ε	$ε_{red}$
	Versuchsreihe 5.		
1	5	0,721	1,443
1/2	2	0,147	1,470
1/4	50	1,776	1,421
1/8	50	0,904	1,445
	Versuchsreihe 6.		
1	2	1,043	5,21
1/2	1	0,268	5,35
1/2	2	0,542	5,42
1/2	5	1,336	5,34
1/20	5	0,130	5,20
1/20	10	0,262	5,24
1/20	20	0,535	5,35
	Versuchsreihe 7.		
1	1	0,694	6,94
1	2	1,343	6,71
1/2	2	0,689	6,89
1/10	25	1,742	6,96
1/10	20	1,357	6,78
1/10	32	2,232	6,97
1/20	5	0,171	6,84
1/20	10	0,324	6,48
1/20	20	0,682	6,82
1/20	35	1,124	6,42
1/20	50	1,733	6,93

Tabelle II. $CuSO_4$.

Versuchsreihe 8.

Konz.	d	ε	$ε_{red}$
1	1	0,068	0,682
1	2	0,134	0,670
1	5	0,335	0,670
1	10	0,659	0,659
1	15	0,992	0,661
1	20	1,366	0,683
1/2	10	0,328	0,655
1/2	15	0,485	0,647
1/2	20	0,654	0,654
1/2	35	1,200	0,686

Versuchsreihe 9.

Konz.	d	ε	$ε_{red}$
1	20	0,689	0,345
1	35	1,238	0,353
1	40	1,396	0,349
1	50	1,748	0,349
1	35	1,223	0,349
1	40	1,395	0,349
1	50	1,734	0,347

ich sicher, dies dem Umstand zuschreiben zu dürfen, daß die Reinigung der Glasteile, auf die man in Versuchen mit den verdünnten $KMnO_4$-Lösungen so peinlichst bedacht sein muß, in diesen ersten Versuchen noch keine genügende war. Die Erfahrungen, die ich hierbei sammelte, kamen aber den übrigen Versuchsreihen zugute, so daß insbesondere die Versuchsreihen 2, 3 und 4, und (mit Ausnahme einiger Versuche) auch die übrigen Versuchsreihen tadellose Ergebnisse in dem Sinne geliefert haben, daß aus ihnen die Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes für $KMnO_4$ klar hervorgeht. Von den beiden mit $CuSO_4$ ausgeführten ist es namentlich Versuchsreihe 10, die, bei derselben Konzentration und bei wechselnder Schichtdicke ausgeführt, zu sehr gut übereinstimmenden Resultaten führte.

C. Versuche an Blutfarbstoff und Derivaten.

Nachdem durch obige Vorversuche erwiesen ist, daß das eingangs erwähnte abweichende Verhalten von Oxyhämoglobin, Hämin und Hämatoporphyrin nicht durch versuchstechnische Fehler bedingt ist, kann ich auf die Besprechung dieser Versuche übergehen. Zu bemerken ist, daß jeder einzelne Farbstoff erst bei einer gewissen Stammkonzentration, dann aber auf das Doppelte, Vierfache usw. verdünnt, untersucht wurde, und zwar in jeder Verdünnung nach Möglichkeit bei verschiedenen Schichtdicken. Weiterhin ist zu bemerken, daß die Oxyhämoglobinlösungen bei $\lambda = 537{,}4\,\mu\mu$, die Häminlösungen bei $\lambda = 605{,}5\,\mu\mu$, die Hämatoporphyrinlösungen bei $\lambda = 568{,}5\,\mu\mu$ untersucht wurden. Die aus den Ablesungen unmittelbar berechneten Extinktionskoeffizienten sind als ε, die auf 0,1 proz. Konzentration reduzierten sogenannten spezifischen Extinktionskoeffizienten als ε_{sp} in den Tabellen III, IV und V, die die Ergebnisse der Versuche enthalten, eingetragen. Die Konzentration ist in Prozenten, die Schichtdicke d in Millimetern angegeben.

Ein Blick auf die Tabellen III, IV und V genügt, um die Unterschiede im Verhalten von $KMnO_4$- und $CuSO_4$-Lösungen einerseits, und den anderen Farbstofflösungen andererseits zu zeigen, indem dort die auf dieselbe Konzentration und dieselbe Schichtdicke reduzierten Werte bloß in einzelnen Versuchsreihen geringe Schwankungen aufweisen, hier aber zahlreiche und größere Schwankungen in jeder Versuchsreihe zur Regel gehören. Fürs erste scheint es, als wären diese Schwankungen ganz regellos; doch läßt sich bei näherer Betrachtung der Werte eine bemerkenswerte Gesetzmäßigkeit nachweisen, die aber erst klar wird, wenn wir an jedem einzelnen der hier verwendeten Farbstoffe zunächst den Einfluß der wechselnden Schichtdicke bei unveränderter Konzentration, sodann umgekehrt den Einfluß der wechselnden Konzentration bei unveränderter Schichtdicke prüfen.

Versuche an Oxyhämoglobin. Vergleicht man innerhalb jeder einzelnen Versuchsreihe die bei derselben Konzentration, jedoch bei verschiedenen Schichtdicken erhaltenen Werte, so ergibt sich, daß die spezifischen Extinktionskoeffizienten (ε auf 0,1 proz. Konzentration bezogen) größer ausfallen, wenn man die Schichtdicken auf das Doppelte erhöht, woraus also hervorgeht, daß am Oxyhämoglobin das Gesetz $J_1 = J_0 \cdot e^{-dk}$ nicht gültig ist, wie dies von einem Kolloid auch zu erwarten war. Vergleicht man weiterhin innerhalb je einer Versuchsreihe die bei derselben Schichtdicke, jedoch bei verschiedenen Konzentrationen erhaltenen Werte, so ergibt sich auch hier, daß die spezifischen Extinktionskoeffizienten größer ausfallen, wenn man die Konzentration auf das Doppelte erhöht, woraus hervorgeht, daß das Hämoglobin auch dem Gesetz $J_1 = J_0 \cdot e^{-ck}$ nicht folgt. Dieses Verhalten der Oxyhämoglobinlösungen ist in der später folgenden Tabelle VI wiedergegeben, in der aus jeder Versuchsreihe diejenigen Versuchsgruppen (meistens Versuchspaare) hervorgeholt sind, die das Gesagte am besten

Tabelle III.

Oxyhämoglobin.

Konz.	d	ε	ε_{sp}
	Versuchsreihe 10.		
1,34	1	1,024	0,764
0,67	2	1,020	0,762
0,335	5	1,289	0,770
0,167	5	0,602	0,719
0,167	10	1,260	0,752
0,0835	10	0,593	0,708
0,0835	20	1,265	0,755
0,0417	20	0,600	0,716
0.0208	50	0,762	0,728
	Versuchsreihe 11.		
1,056	1	0,805	0,761
1,056	2	1,911	0,905
0,528	1	0,392	0,742
0,528	2	0,793	0,751
0,263	5	1,006	0,762
0,1315	5	0,475	0,720
0,1315	10	0,962	0,729
0,0657	10	0,481	0,729
0,0657	20	1,020	0,773
0,0328	10	0,238	0,723
0,0328	20	0,495	0,749
0,0328	35	0,806	0,697
0,0328	50	1,182	0,716
0,0164	35	0,341	0,592
0,0164	50	0,554	0,671
0,0164	85	1,027	0,732

Konz.	d	ε	ε_{sp}
	Versuchsreihe 12.		
0,77	1	0,589	0,764
0,77	2	1,217	0,790
0,385	1	0,293	0,762
0,385	2	0,589	0,764
0,385	5	1,585	0,824
0,192	5	0,729	0,756
0,192	10	1,618	0,840
0,096	5	0,369	0,762
0,096	10	0,721	0,750
0,096	20	1,655	0,874
0,048	20	0,728	0,754
0,048	35	1,319	0,783
0,012	50	0,426	0,709
0,012	85	0,721	0,731
0,012	100	0,880	0,731
	Versuchsreihe 13.		
0,196	5	0,748	0,763
0,098	5	0,374	0,763
0,098	10	0,756	0,771
0,098	15	1,175	0,708
0,098	20	1,796	0,916
0,049	15	0,565	0,769
0,049	20	0,758	0,773
0,049	35	1,448	0,844

Tabelle IV. Hämin.

Konz.	d	ε	ε_{sp}
	Versuchsreihe 14 *).		
0,02	1	0,138	6,92
0,02	2	0,284	7,11
0,02	5	0,711	7,11
0,02	10	1,537	7,68
0,01	10	0,705	7,05
0,01	20	1,537	7,68
0,005	20	0,722	7,22
0,005	35	1,323	7,56
0,0025	50	0,893	7,14
0,00125	100	0,915	7,32
0,00063	200	0,909	7,24
	Versuchsreihe 15 *).		
0,04	1	0,307	7,67
0,04	2	0,611	7,64
0,02	5	0,749	7,49
0,02	10	1,630	8,15
0,01	10	0,750	7,50
0,01	20	1,664	8,32
0,005	20	0,759	7,59
0,005	35	1,448	8,27
0,0025	50	0,949	7,59
0,00125	100	0,944	7,55
0,00063	200	0,927	7,42
	Versuchsreihe 16 *).		
0,02	1	0,146	7,28
0,02	2	0,283	7,08
0,02	5	0,733	7,33
0,02	10	1,608	8,04
0,01	10	0,705	7,05
0,01	20	1,563	7,82
0,005	20	0,701	7,01
0,005	35	1,281	7,32
0,0025	50	0,907	7,26
0,00125	100	0,906	7,25
0,00063	200	0,881	7,05
	Versuchsreihe 17 *).		
0,04	1	0,313	7,83
0,04	2	0,634	7,92
0,02	5	0,768	7,68
0,02	10	1,706	8,53
0,01	10	0,765	7,65
0,01	20	1,675	8,37
0,005	20	0,760	7,60
0,005	35	1,425	8,15
0,0025	50	0,956	7,64
0,00125	100	0,954	7,63
0,00063	200	0,990	7,92

Konz.	d	ε	ε_{sp}
	Versuchsreihe 18 **).		
0,02	5	0,753	7,53
0,02	10	1,686	8,43
0,005	10	0,356	7,12
0,005	20	0,715	7,15
0,005	31	1,129	7,28
0,0025	20	0,358	7,16
0,0025	35	0,624	7,13
0,0025	50	0,882	7,06
0,00125	50	0,413	6,61
0,00125	85	0,755	7,10
0,00125	100	0,904	7,23
	Versuchsreihe 19 **).		
0,12	1	0,891	7,42
0,12	2	2,291	9,54
0,03	1	0,222	7,41
0,03	2	0,435	7,26
0,03	5	1,128	7,52
0,015	5	0,553	7,37
0,015	10	1,145	7,63
0,0075	5	0,269	7,17
0,0075	10	0,544	7,27
0,0075	20	1,105	7,37
0,00375	20	0,565	7,53
0,00375	35	0,944	7,19
0,001875	35	0,486	7,40
0,001875	50	0,698	7,44
0,001875	85	1,231	7,72
0,001875	100	1,493	7,96
	Versuchsreihe 20 **).		
0,02	1	0,149	7,43
0,02	2	0,296	7,40
0,02	5	0,736	7,36
0,02	10	1,632	8,16
0,01	10	0,721	7,21
0,01	20	1,552	7,76
0,005	20	0,684	6,84
0,005	35	1,340	7,66
0,0025	50	0,942	7,53
0,00125	100	0,915	7,32
0,00063	200	0,969	7,75

*) Lösungsmittel: n/10 NaOH. — **) Lösungsmittel: verdünnte $(NH_4)OH$-Lösung.

Tabelle V.

Hämatoporphyrin.

Konz.	d	ε	ε_{sp}
Versuchsreihe 21 *).			
0,04	1	0,360	9,00
0,04	2	0,701	8,76
0,04	5	2,082	10,41
0,02	2	0,352	8,80
0,02	5	0,885	8,85
0,02	10	2,020	10,10
0,01	5	0,445	8,90
0,01	10	0,893	8,93
0,005	10	0,448	8,96
0,005	20	0,894	8,94
Versuchsreihe 22 *).			
0,02	1	0,179	8,96
0,02	2	0,337	8,43
0,02	5	0,892	8,92
0,02	10	1,963	9,81
0,01	10	0,845	8,45
0,01	20	1,968	9,84
0,005	20	0,858	8,58
0,005	35	1,599	9,14
0,0025	50	0,993	7,95
0,00125	100	1,030	8,24
0,00063	200	1,078	8,60
Versuchsreihe 23 *).			
0,02	1	0,167	8,37
0,02	2	0,348	8,70
0,02	5	0,877	8,77
0,02	10	2,203	11,02
0,01	10	0,864	8,64
0,01	20	2,224	11,12
0,005	20	0,875	8,75
0,005	35	1,631	9,32
0,0025	50	1,063	8,51
0,00125	100	1,101	8,81
0,00063	200	1,078	8,62

Konz.	d	ε	ε_{sp}
Versuchsreihe 24 **).			
0,04	1	0,271	6,77
0,04	2	0,533	6,67
0,04	5	1,396	6,98
0,02	2	0,260	6,51
0,02	5	0,643	6,43
0,02	10	1,400	7,00
0,01	5	0,319	6,38
0,01	10	0,670	6,71
0,005	10	0,332	6,64
0,005	20	0,667	6,67
0,0025	20	0,325	6,50
0,0025	35	0,582	6,65
0,0025	50	0,869	6,95
Versuchsreihe 25 **).			
0,02	1	0,133	6,66
0,02	2	0,280	7,01
0,02	5	0,671	6,71
0,02	10	1,516	7,58
0,01	10	0,671	6,71
0,01	20	1,432	7,16
0,005	20	0,667	6,68
0,005	35	1,193	6,82
0,0025	50	0,834	6,67
0,00125	100	0,847	6,77
0,00063	200	0,878	7,02
Versuchsreihe 26 **).			
0,01	10	0,669	6,69
0,01	20	1,390	6,95
0,005	20	0,665	6,65
0,005	35	1,197	6,84
0,0025	50	0,809	6,47
0,00125	100	0,813	6,50
0,00063	200	0,842	6,73

*) Lösungsmittel: Alkohol. — **) Lösungsmittel: n/10 KOH.

Tabelle VI.

Oxyhämoglobin.

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 10.		
0,335	5	0,770
0,167	5	0,719
0,167	10	0,752
0,0835	10	0,708
0,0835	20	0,755
0,0417	20	0,716
Versuchsreihe 11.		
1,056	1	0,761
1,056	2	0,905
0,528	1	0,742
0,0657	10	0,729
0,0657	20	0,773
0,0164	35	0,592
0,0164	50	0,671
0,0164	85	0,732

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 12.		
0,385	2	0,764
0,385	5	0,824
0,192	5	0,756
0,192	10	0,840
0,096	10	0,751
0,096	20	0,874
0,048	20	0,754
0,048	35	0,783
Versuchsreihe 13.		
0,098	5	0,763
0,098	10	0,771
0,098	20	0,916
0,049	20	0,769
0,049	35	0,844

beleuchten; und zwar sind die mit gleicher Konzentration und mit verschiedenen Schichtdicken erhaltenen spezifischen Extinktionskoeffizienten von *rechts* her, die mit gleicher Schichtdicke und verschiedenen Konzentrationen erhaltenen spezifischen Extinktionskoeffizienten von *links* her mit je einer Klammer verbunden.

In manchen Versuchsreihen gibt es eine Anzahl solcher Versuchsgruppen (-paare), in anderen bloß eine einzige; doch kann dies nicht wundernehmen, wenn man der zahlreichen Fehlerquellen eingedenk ist, die bei solchen Versuchen eine störende Rolle spielen können. a) So gehen die spektrophotometrischen Bestimmungen mit Fehlern einher, die kaum weniger als 1 bis mehrere Prozent ausmachen. b) Es können Fehler bei der Anfertigung der Verdünnungen vorkommen, durch die es wahrscheinlich zu den in einigen Versuchsreihen sichtbaren „Stufen" in der Reihe des spezifischen Extinktionskoeffizienten gekommen ist. c) Zu größeren Unstimmigkeiten kann die bekannte Eigenschaft des Oxyhämoglobins führen, daß die Lichtabsorption seiner Lösungen auch bei niederer Temperatur und bei Lichtabschluß mit der Zeit Veränderungen erleidet, die noch größer werden, wenn sich diese Kautelen nicht einhalten lassen. Im ungünstigsten Falle kann das Zusammentreffen aller dieser Fehlerquellen Verschiebungen bewirken, durch die das zu erwartende Ergebnis verzerrt oder gar in das Gegenteil verwandelt wird! Auffallend ist auch, daß es unter den Versuchspaaren mit den Schichtdicken von 1 und 2 mm weit weniger solche gibt, die eine Verschiedenheit

der spezifischen Extinktionskoeffizienten bei verschiedenen Schichtdicken aufweisen, als unter den bei größeren Schichtdicken ausgeführten Versuchen. Daß es sich hierbei um einen Zufall handeln würde, ist ebensowenig wahrscheinlich, wie daß die Glasklötze von 19 und 18 mm Höhe, mittels deren die Schichtdicken von 1 und 2 mm erreicht werden, bei ihrer Herstellung falsch bemessen worden wären. Gegen letztere Annahme spricht allein schon der Umstand, daß die reduzierten Extinktionskoeffizienten bei der Verwendung derselben Glasklötze in den mit $KMnO_4$ und $CuSO_4$ ausgeführten Versuchsreihen (Tabellen I und II) nicht verschieden von den bei anderen Schichtdicken erhaltenen waren. Eher läßt sich annehmen, daß in den stärksten Hämoglobinkonzentrationen, für die eben die Schichtdicken von 1 und 2 mm angewendet werden mußten, zurzeit nicht näher zu bezeichnende Verhältnisse vorliegen, die verschieden sind von denen, die in Lösungen von geringerer Konzentration herrschen; die Verschiedenheit kann sowohl die Zahl wie auch das sonstige Verhalten der dispergierten Teilchen betreffen.

Das geschilderte Verhalten der Oxyhämoglobinlösung ist typisch für kolloide Lösungen, die dem *Beer*schen Gesetz nicht huldigen. Man hat es eben mit einer, wenn auch feinsten Dispersion zu tun, deren dispergierte Teilchen *Licht nicht nur absorbieren, sondern auch zerstreuen, reflektieren.*

Um so merkwürdiger ist eine Gesetzmäßigkeit, die aus der näheren Betrachtung der Tabelle VI hervorgeht, in der die Versuche von oben herunter nach abnehmender Konzentration und nach zunehmenden Schichtdicken geordnet sind, demzufolge innerhalb je eines Versuchspaares die besprochene Zunahme des spezifischen Extinktionskoeffizienten bei zunehmender Schichtdicke von oben nach unten, bei zunehmender Konzentration von unten nach oben in Erscheinung tritt. Wir wollen nun in jeder Versuchsreihe von allen in Tabelle VI verzeichneten Versuchen bloß diejenigen herausholen, in denen die Konzentration in demselben Maße (auf die Hälfte, den vierten Teil usw.) absinkt, wie die Schichtdicke (auf das Doppelte, auf das Vierfache usw.) zugenommen hat, sie durch solche Versuche aus Tabelle III ergänzen, in denen Konzentration und Schichtdicke ebenfalls einander umgekehrt proportional sich verhalten, die aber, weil sie keine entsprechenden Versuchspaare lieferten, in Tabelle VI nicht aufgenommen werden konnten, und alle diese Versuche in nachfolgender Tabelle VII zusammenstellen.

Aus Tabelle VII scheint fürs erste hervorzugehen, daß *alle spezifischen Extinktionskoeffizienten angenähert denselben Wert haben*, als ob, in Widerspruch mit unseren früheren Feststellungen, *das Beersche Gesetz für Oxyhämoglobinlösungen ebenso gültig wäre wie für die meisten*

Tabelle VII.

Oxyhämoglobin.

Versuchsreihe 10.

Konz.	d	ε_{sp}
1,34	1	0,764
0,67	2	0,762
0,335	5	0,770
0,167	10	0,752
0,0835	20	0,708
0,0417	20	0,716
0,0208	50	0,728

Versuchsreihe 12.

Konz.	d	ε_{sp}
0,77	1	0,764
0,385	2	0,762
0,192	5	0,756
0,096	10	0,750
0,048	20	0,754
0,012	50	0,709

Versuchsreihe 13.

Konz.	d	ε_{sp}
0,196	5	0,763
0,098	10	0,771
0,049	20	0,773

gefärbten Kristalloide (sofern an diesen Assoziation, Dissoziation usw. nicht hineinspielen). Eine Erklärung dieser paradox anmutenden Erscheinung wollen wir weiter unten versuchen und vorerst prüfen, ob sich die beiden anderen Farbstoffe dem Oxyhämoglobin analog verhalten oder nicht.

Versuche an Hämin. Führt man in den an Hämin ausgeführten Versuchen dieselbe Gruppierung wie am Oxyhämoglobin durch, so erhält man die in den Tabellen VIII und IX zusammengestellten Ergebnisse.

Laut Tabelle VIII erleiden die spezifischen Extinktionskoeffizienten bei Verdopplung der Schichtdicke eine Erhöhung, bei Verringerung der Konzentration eine Herabsetzung. Auch hier fällt es auf, daß die Erhöhung bei den Schichtdicken 1 und 2 mm weit seltener zu beobachten ist als bei Verwendung größerer Schichtdicken, und laut Tabelle IX *behalten auch hier* geradeso wie am Oxyhämoglobin *die spezifischen Extinktionskoeffizienten ihren konstanten Wert, wenn mit abnehmender Konzentration eine proportional zunehmende Schichtdicke verwendet wird.* Doch muß hier noch der Umstand erörtert werden, daß von Rechts wegen die Extinktionskoeffizienten, die als spezifische alle auf die einheitliche Konzentration von 0,1 Proz. bezogen sind, nicht nur innerhalb *einer* Versuchsreihe, sondern in allen Versuchsreihen denselben Wert aufweisen müßten, dies aber in unseren Versuchen sichtlich nicht der Fall ist. Es rührt dies offenbar davon her, daß es mir bei der Bereitung je einer Stammlösung auf höchste Ge-

Tabelle VIII.

Hämin.

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 14.		
0,02	5	7,11
0,02	10	7,68
0,01	10	7,05
0,01	20	7,68
0,005	20	7,22
0,005	35	7,56
Versuchsreihe 15.		
0,02	5	7,49
0,02	10	8,15
0,01	10	7,50
0,01	20	8,32
0,005	20	7,59
0,005	35	8,27
Versuchsreihe 16.		
0,02	5	7,33
0,02	10	8,04
0,01	10	7,05
0,01	20	7,82
0,005	20	7,01

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 17.		
0,02	5	7,68
0,02	10	8,53
0,01	10	7,65
0,01	20	8,37
0,005	20	7,60
0,005	35	8,15
Versuchsreihe 18.		
0,02	5	7,53
0,02	10	8,43
0,005	20	7,15
Versuchsreihe 19.		
0,12	1	7,42
0,12	2	9,54
0,03	2	7,26
Versuchsreihe 20.		
0,02	5	7,36
0,02	10	8,16
0,01	10	7,21
0,01	20	7,76
0,005	20	6,84
0,005	35	7,66

Tabelle IX.

Hämin.

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 14.		
0,02	5	7,11
0,01	10	7,05
0,005	20	7,22
0,0025	50	7,14
0,00125	100	7,32
0,00063	200	7,24
Versuchsreihe 15.		
0,04	2	7,64
0,02	5	7,49
0,01	10	7,50
0,005	20	7,59
0,0025	50	7,59
0,00125	100	7,55
0,00063	200	7,42

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 16.		
0,02	5	7,33
0,01	10	7,05
0,005	20	7,01
0,0025	50	7,26
0,00125	100	7,25
0,00063	200	7,05
Versuchsreihe 17.		
0,04	2	7,92
0,02	5	7,68
0,01	10	7,65
0,005	20	7,60
0,0025	50	7,64
0,00125	100	7,63
0,00063	200	7,92

Tabelle IX (Fortsetzung).

Versuchsreihe 18.

Konz.	d	ε_{sp}
0,02	5	7,53
0,005	10	7,12
0,0025	20	7,16
0,00125	50	6,61

Versuchsreihe 19.

Konz.	d	ε_{sp}
0,12	1	7,42
0,03	2	7,26
0,015	5	7,37
0,0075	10	7,27
0,00375	20	7,53
0,00188	50	7,44

Versuchsreihe 20.

Konz.	d	ε_{sp}
0,02	5	7,36
0,01	10	7,21
0,005	20	6,84
0,0025	50	7,53
0,00125	100	7,32
0,00063	200	7,75

nauigkeit nicht angekommen war, um so weniger, da nicht immer vollkommene Lösung des Hämins erzielt werden konnte. Ein Unterschied in dem Verhalten zwischen Häminlösungen, die mit Natronlauge bzw. Ammoniak bereitet wurden, konnte nicht nachgewiesen werden.

Versuche an Hämatoporphyrin. Bemerkenswert waren die an Hämatoporphyrin erhaltenen Ergebnisse, die prinzipiell durchaus mit den an Oxyhämoglobin und an Hämin gewonnenen im Einklang stehen und in den Tabellen X und XI zusammengestellt sind. Um gleich die Daten der Tabelle XI vorwegzunehmen, kann konstatiert werden, *daß bei abnehmender Konzentration und in demselben Verhältnis zunehmender Schichtdicke die spezifischen Extinktionskoeffizienten wieder angenähert denselben Wert beibehalten.* Aus Tabelle X geht aber hervor, daß in der alkoholischen Lösung des Hämatoporphyrins die zunehmende Schichtdicke bei derselben Konzentration oder die zunehmende Konzentration bei derselben Schichtdicke eine bis zu 25 Proz. betragende Änderung des spezifischen Extinktionskoeffizienten bewirken kann; während diese Änderung in dem in Alkali gelösten Oxyhämoglobin und Hämin bloß nur etwa 10 Proz. betrug, gleichwie auch in der alkalischen Lösung des Hämatoporphyrins. Es ist sehr wahrscheinlich, daß an diesem verschiedenen Verhalten der alkalischen Lösungen einerseits und der alkoholischen andererseits das Lösungsmittel einen wesentlichen, wenn nicht ausschlaggebenden Anteil hat: in der alkalischen Lösung des Oxyhämoglobins, des Hämins und des Hämatoporphyrins dürfte die Dispersion der Teilchen offenbar eine feinere sein als in der alkoholischen Lösung des Hämatoporphyrins.

Tabelle X. Hämatoporphyrin.

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 21 *).		
0,04	2	8,76
0,04	5	10,41
0,02	5	8,85
0,02	10	10,10
0,01	10	8,93
Versuchsreihe 22 *).		
0,02	5	8,92
0,02	10	9,81
0,01	10	8,45
0,01	20	9,84
0,005	20	8,58
0,005	35	9,14
0,0025	50	7,95
Versuchsreihe 23 *).		
0,02	5	8,77
0,02	10	11,02
0,01	10	8,64
0,01	20	11,12
0,005	20	8,75
0,005	35	9,32
0,0025	50	8,50
Versuchsreihe 24 **).		
0,04	2	6,67
0,04	5	6,98
0,02	5	6,43
0,02	10	7,00
0,01	10	6,71
Versuchsreihe 25 **).		
0,02	5	6,71
0,02	10	7,58
0,01	10	6,71
0,01	20	7,16
0,005	20	6,68

Tabelle XI. Hämatoporphyrin.

Konz.	d	ε_{sp}
Versuchsreihe 21.		
0,04	1	9,00
0,02	2	8,80
0,01	5	8,90
0,005	10	8,96
Versuchsreihe 22.		
0,02	5	8,92
0,01	10	8,45
0,005	20	8,58
0,0025	50	7,95 (?)
0,00125	100	8,24 (?)
0,00063	200	8,60
Versuchsreihe 23.		
0,02	5	8,77
0,01	10	8,64
0,005	20	8,75
0,0025	50	8,51
0,00125	100	8,81
0,00063	200	8,62
Versuchsreihe 24.		
0,04	2	6,67
0,02	5	6,43
0,01	10	6,71
0,005	20	6,67
0,0025	50	6,95
Versuchsreihe 25.		
0,02	5	6,71
0,01	10	6,71
0,005	20	6,68
0,0025	50	6,67
0,00125	100	6,78
0,00063	200	7,02
Versuchsreihe 26.		
0,01	10	6,69
0,005	20	6,65
0,0025	50	6,47
0,00125	100	6,50
0,00063	200	6,73

*) Lösungsmittel: Alkohol. — **) Lösungsmittel: n/10 KOH.

D. Schlußfolgerungen.

Wie sind nun die oben erörterten Erscheinungen zu deuten? Was läßt sich aus ihnen folgern?

Was die Zunahme der spezifischen Extinktionskoeffizienten bei zunehmender Schichtdicke und unveränderter Konzentration anbelangt, rührt sie zweifellos davon her, daß neben der Absorption auch eine *Zerstreuung* des Lichtes durch die dispergierten Teilchen stattfindet, und daß diese Zerstreuung anderen Gesetzen huldigt, zum mindesten nach anderen Proportionen erfolgt als die Absorption allein; denn würde die *Zerstreuung* durch die Änderung (z. B. Verdopplung) der Schichtdicke in demselben Grade vermehrt wie die Absorption allein, so müßte der Extinktionskoeffizient seinen ursprünglichen Wert beibehalten. Dasselbe gilt auch für die Zunahme der spezifischen Extinktionskoeffizienten bei zunehmender Konzentration und unveränderter Schichtdicke, und auch hier muß die Zerstreuung des Lichtes sich in anderen Proportionen ändern als die Absorption allein.

Wie kommt es nun, daß, wenn Konzentration und Schichtdicke in gleicher, jedoch umgekehrter Proportion geändert werden, *die spezifischen Extinktionskoeffizienten*, wie aus den Tabellen VII, IX und XI ersichtlich, *ihren ständigen Wert beibehalten*, sich also Oxyhämoglobin, Hämin und Hämatoporphyrin anscheinend wie Farbstofflösungen verhalten, die dem *Beer*schen Gesetz huldigen? Durch die Vergrößerung (z. B. Verdopplung) der Schichtdicke wird die Zerstreuung des Lichtes vergrößert, durch die proportionale Herabsetzung der Konzentration (z. B. auf die Hälfte) herabgesetzt, und zwar, wie wir oben sahen, nach einer anderen Proportion als die Absorption allein. Die gleichzeitige Zunahme der Schichtdicke und entsprechend starke Herabsetzung der Konzentration stellen zwei Momente dar, durch die die Zerstreuung des Lichtes im entgegengesetzten Sinne verändert wird. Sind die beiden entgegengesetzt gerichteten Momente von verschiedener Größe, so werden nach Maßgabe dieses Unterschiedes die Extinktionskoeffizienten, wenn man sie nach Konzentration und Schichtdicke ordnet, einen stärkeren oder geringeren „Gang" in der einen oder der anderen Richtung aufweisen. Sind sie aber von derselben Größe, so heben sie sich gegenseitig auf, und man erhält spezifische Extinktionskoeffizienten von durchwegs unverändertem Werte. Letzteres ist höchstwahrscheinlich an den drei von mir untersuchten Farbstoffen der Fall. Infolge der mannigfachen oben erwähnten Fehlerquellen zeigen zwar die in den Tabellen VII, IX und XI zusammengestellten Werte gewisse Schwankungen, jedoch keinen „Gang", so daß man ihre prinzipielle Konstanz annehmen kann, woraus sich wieder folgern läßt, daß bezüglich der Zerstreuung des Lichtes durch

die dispergierten Teilchen eine Gesetzmäßigkeit besteht, die vom *Beer*schen Gesetz bezüglich der Absorption des Lichtes wohl verschieden, jedoch ihr in gewisser Beziehung analog ist.

Was endlich die Frage anbelangt, *ob* nach alledem *die Konzentration solcher Farbstofflösungen auf dem Wege der Spektrophotometrie bestimmt werden kann oder nicht, so muß gesagt werden, daß dies*, solange die erwähnte Gesetzmäßigkeit nicht quantitativ erfaßt werden kann, *nicht, wenigstens nicht ohne recht erhebliche Fehler möglich ist.* Denn bereits die Feststellung der Konstante A stößt auf Schwierigkeiten, die zurzeit nicht überbrückt werden können, indem die Gleichung

$$A = c : \varepsilon$$

nur einen Sinn hat, wenn sich ε proportional der Konzentration ändert, was aber in unseren Lösungen, wie wir gesehen haben, nicht der Fall ist.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *P. Hári* ausgeführt.

Skatoxylschwefelsäure im Harn.

Von

Georg Scheff.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 15. Oktober 1926.)

Die Skatoxylschwefelsäure, die in der Regel im Anschluß an die Indoxylschwefelsäure besprochen wird, ist im Harn bis vor kurzem nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden. Ebensowenig war die Identität eines Skatoxylchromogens, das bereits lange in der Literatur fortlebt, mit Skatoxylschwefel- oder Skatoxylglykuronsäure bewiesen, oder aber seine Beziehung zum Skatolrot bzw. die Beziehung des Skatolrots zu den anderen Harnfarbstoffen, insbesondere zum Urorosein, geklärt.

Bereits durch *Brieger*[1]), dem das Verdienst gehört, Skatol im Destillationsprodukt des Kotes entdeckt zu haben, wurde nachgewiesen, daß, wenn Skatol in den Organismus eingebracht wird, ein Chromogen im Harn erscheint, das durch Spaltung mit konzentrierten Mineralsäuren in Gegenwart eines Oxydationsmittels einen weinroten Farbstoff, das von *Brieger* so genannte Skatolrot liefert, das, wie er bereits meinte, mit den von anderen Autoren als Urorosein, Uroerythrin, Urorubin und Purpurin benannten Farbstoffen identisch sein mag. Durch Anwendung des von ihm in Gemeinschaft mit *Baumann*[2]) zur Darstellung des indoxylschwefelsauren Kaliums ausgearbeiteten Verfahrens ist es *Brieger*[3]) gelungen, aus dem Harn von Hunden, denen Skatol einverleibt wurde, eine Substanz zu isolieren, die er als skatoxylschwefelsaures Kalium bzw. als Chromogen des Skatolrots ansprach. Einige Jahre später will *Otto*[4]), unter Beibehaltung der von *Brieger* eingeschlagenen

---

[1]) *L. Brieger*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **10**, 1027; **12**, 1985; **13**, 279. Journ. f. prakt. Chem., N. F., **17**, 124.

[2]) *E. Baumann* und *L. Brieger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **3**, 254.

[3]) *L. Brieger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **4**, 414, 1880; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **12**, 1985.

[4]) *J. Otto*, Pflügers Arch. **33**, 614.

Methodik, Skatoxylverbindungen aus dem Harn eines Diabetikers mit interkurrierenden Magen- und Darmstörungen erhalten haben, jedoch in so geringer Ausbeute, daß eine Identifizierung der Substanz nicht möglich war. Inzwischen hatten *M. Nencki*[1]) und dann auch *E.* und *H. Salkowski*[2]) das Skatol unter den Eiweißfäulnisprodukten aufgefunden, und gelang es *Emil Fischer*[3]), Skatol synthetisch darzustellen. Hierdurch wurde der ganze Fragenkomplex einer experimentellen Prüfung leichter zugänglich, jedoch ergaben sich mit der größeren Zahl der einschlägigen Mitteilungen auch einander widersprechende Befunde. Diese Unsicherheit rührt einerseits davon her, daß die Menge des ausgeschiedenen hypothetischen Chromogens durchaus nicht im Verhältnis steht zur Menge des im Versuch von außen eingeführten Skatols, andererseits davon, daß bei der Schwierigkeit, das Chromogen als solches darzustellen, die Schwefelsäure, eines der Paarlinge, als Maßstab der Chromogenbildung verwendet werden mußte. Zuweilen mußte die Beweisführung der stattgehabten Chromogenbildung auf Umwegen versucht werden. So fand zwar *Mester*[4]) nach Einverleibung von Skatol eine Zunahme der gepaarten Schwefelsäuren, sie betrug aber kaum ein Fünftel des eingeführten Skatols. Er nahm daher in Anlehnung an die bereits von *P. Mayer* und *Neuberg*[5]) vermutete Existenz einer Skatoxylglykuronsäure an, daß das gebildete Skatoxyl, soweit der Vorrat an Schwefelsäure reicht, an diese, ein anderer, vielleicht größerer Anteil, jedoch an Glykuronsäure gebunden im Harn ausgeschieden wird.

Diese Annahme scheint durch die Beobachtung gestützt zu werden, daß ein Skatolharn optisch (nach links) aktiv ist und Kupferoxydsalze in alkalischer Lösung reduziert. Andererseits vermißte jedoch *Stokvis*[6]) unter den Zersetzungsprodukten des von ihm dargestellten magnesiumhaltigen Chromogens, der angeblichen Muttersubstanz des Skatolrots, sowohl Schwefelsäure wie auch Glykuronsäure. *Maillard*[7]) bezweifelt sogar die Möglichkeit, daß aus dem Skatol ein dem Indoxyl analoges Skatoxyl entstehen könnte, denn das OH-Radikal hätte gerade an dem C-Atom einzutreten, wo sich die CH_3-Gruppe befindet, daher aus

---

[1]) *M. Nencki*, Centralbl. f. d. med. Wiss. 1878, Nr. 47; Journ. f. prakt. Chem. 1879, Heft 19/20, S. 446; Zeitschr. f. physiol. Chem. **4**, 371.

[2]) *E.* und *H. Salkowski*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **12**, 648; **13**, 189; Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**, 417; **9**, 23.

[3]) *E. Fischer*, Liebigs Ann. **236**, 137.

[4]) *B. Mester*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **12**, 130.

[5]) *P. Mayer* und *C. Neuberg*, ebendaselbst **29**, 267.

[6]) *Stokvis*, Ned. Tijdschr. v. Gen. 1901, Teil I, S. 961; 1903, Teil II, S. 678.; Hand. Ned. Nat. en Gen. Congr. 1901, S. 249.

[7]) *L. C. Maillard*, Paris, Schleicher frères, 1903; Journ. de Pharm. et Chim. **21**, 187, 1905; Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 515, 1905.

Skatol wieder nur Indoxyl, nicht aber Skatoxyl entstehen könne. Daher vermutet *Maillard* sogar, daß das *Brieger*sche Skatolrot bloß ein auch Indirubin enthaltendes Gemisch von Farbstoffen sei, und bestreitet *Rosin*[1]), als Verfechter des Indirubins, die Existenz des Skatolrots überhaupt. Sowohl von französischer Seite, wie *Porcher* und *Hervieux*[2]), als auch von deutscher Seite, wie *Grosser*[3]) und *Staal*[4]), entstanden dem Skatolrot beredte Verteidiger, wobei zu bemerken ist, daß letztere an eine Grundverschiedenheit zwischen Indirubin und Skatolrot schon aus dem Grunde festhalten, weil bloß ersteres in Chloroform löslich ist. Zur Erklärung vielfacher Widersprüche bezüglich des Entstehens bzw. Nichtentstehens des Skatolchromogens im Harn nimmt *Grosser* an, daß sich die Synthese im normalen, nicht mit Skatol vorbehandelten Organismus anders vollzieht als an dem vorbehandelten: Im ersteren paart sich eingeführtes Skatol mit Schwefelsäure, im letzteren möglicherweise mit Glucuronsäure.

Später schien das Skatolrotproblem einerseits durch die Befunde von *Homer*[5]) der Lösung näher gebracht worden zu sein, indem es ihr gelungen sein soll, zwischen Skatolrot und Urorosein trotz der Ähnlichkeit ihrer Farbenreaktion und ihrer Absorptionsstreifen auf spektroskopischem Wege zu unterscheiden; andererseits durch die Arbeiten von *Laidlow* und *Ewins*[6]) und *Herter*[7]), durch die die Indolessigsäure als Muttersubstanz des Uroroseins erkannt wurde; *Maillards* oben erwähnte Annahme, daß Skatolrot bloß ein Indirubin enthaltendes Farbstoffgemisch sei, macht sich auch *Homer* teilweise zu eigen, indem sie das Skatolrot als ein Gemisch zweier Farbstoffe ansieht, die sich bezüglich ihres spektralen Verhaltens gegenseitig so beeinflussen, daß auf diese Weise die Anwesenheit von Urorosein vorgetäuscht wird, weiterhin als möglich annimmt, daß einer dieser beiden Farbstoffe Eigenschaften besitzt, die auch dem Indirubin gemein sind. Hierzu muß jedoch bemerkt werden, daß damit nichts für oder gegen das Skatoxyl als Muttersubstanz des Skatolrots gesagt ist. Die (vielleicht nur scheinbar) widersprechenden Erscheinungen, die nach Einfuhr von Skatol zu konstatieren sind, erklärt *Homer* wie folgt: An den der Skatoleinverleibung folgenden Tagen wird dieses zum überwiegenden Teile in Skatoxyl bzw. in dessen Verbindungen überführt, wobei aller-

[1]) *Rosin*, Virchows Arch. **123**, 591.

[2]) *Ch. Porcher* und *Ch. Hervieux*, C. r. de l'acad. des sciences à Paris **138**, 1725, 1904; Journ. de Pharm. et Chim. **21**, 55, 1905; Journ. de Physiol. **7**, 815, 1905; Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 486, 1905.

[3]) *P. Grosser*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 320, 1905.

[4]) *J. Ph. Staal*, ebendaselbst **46**, 236, 1905.

[5]) *A. Homer*, Journ. of biol. Chem. **22**, 345, 1915.

[6]) *Laidlow* und *Ewins*, The Biochem. Journ. **7**, 18, 1913.

[7]) *C. A. Herter*, Journ. of biol. Chem. **4**, 239 und 253, 1908.

dings ein geringer Teil des Skatols sich mit Indoxyl zu einem dem Indirubin ähnlichen Stoffe verbindet, das restliche Skatol aber in Indoxyl übergeführt wird. Daß nach wenigen Tagen eine starke Abnahme der Skatoxyl-, eine ebenso starke Zunahme der Indoxyl- (Indican-) Reaktion wahrzunehmen ist, wird so erklärt, daß nun der überwiegende Teil des Skatols in Indoxyl verwandelt wird.

Wie aus dieser kurzen Übersicht leicht zu ersehen ist, handelt es sich in obigen Mitteilungen meistens nur um eine indirekte Beweisführung pro und contra, und hiervon auch abgesehen, können weder die angewandte Versuchstechnik, noch aber die mitgeteilten Versuchsprotokolle einer einigermaßen strengen Kritik standhalten. Was sich ihnen entnehmen läßt, ist:

1. daß es ein und dasselbe komplexe Molekül ist, das sowohl Indoxyl wie auch Skatoxyl liefert;

2. daß das im Organismus (Darm) gebildete Indol als Indoxylschwefelsäure bzw. Indoxylglucuronsäure ausgeschieden wird;

3. daß die aus Harn durch Säure (und Oxydationsmittel) auf verschiedene Weise darstellbaren roten Farbstoffe offenbar von verschiedener Natur sind, jedoch alle von Skatol herrühren;

4. daß die Menge des aus Harn abspaltbaren sogenannten Skatolrots und der gepaarten Schwefelsäuren nach Skatoleinfuhr zunimmt.

Das, woran es in obigen Versuchen mangelt, nämlich die zu einer exakten Beweisführung unumgänglich notwendige direkte quantitative Bestimmung der Skatoxylschwefelsäure war in unseren nachfolgend zu beschreibenden Versuchen dadurch gegeben, daß es *mir*[1]) gelungen ist, ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung des aus jedem Menschenharn durch Kondensation mit p-Dimethylamidobenzaldehyd nach *Hári*[2]) darzustellenden Farbstoffs auszuarbeiten, von welch letzterem es sich mit größter Wahrscheinlichkeit nachweisen ließ, daß es einen Skatoxylpaarling enthält[2]). Findet demnach eine Bildung von Skatoxylschwefelsäure aus eingeführtem Skatol statt, so muß, da nach meinen Erfahrungen Hundeharn sich ebenso wie Menschenharn verhält, auch im Harn von Hunden offenbar Skatoxyl in erhöhter Menge nachzuweisen sein, wenn ihnen Skatol auf irgend eine Weise beigebracht wird. Es ist in *Háris* erwähnter Arbeit[3]) schon ein Hinweis enthalten, in welcher Form der Skatoxylpaarling im Harn enthalten sein oder aus welcher anderen Verbindung er im Laufe der Darstellung als komplexer Skatoxylfarbstoff entstehen könnte. Näheres aber konnte erst

[1]) *G. Scheff*, diese Zeitschr. 158, 170, 1925.

[2]) *P. Hári*, ebendaselbst 117, 41, 1921; *G. Scheff*, ebendaselbst 158 167, 1925.

[3]) *P. Hári*, diese Zeitschr. 168, 453, 1925.

durch meine hier mitgeteilten Versuche ermittelt werden, indem ich von der *Annahme ausging, daß es sich um gepaarte Schwefelsäuren handelt mit einem Skatoxyl als Alkoholpaarling*. Es ergeben sich auf Grund dieser Überlegungen notwendigerweise folgende Gesichtspunkte, die, wenn genau berücksichtigt, einen tieferen Einblick in die Vorgänge gestatten und zu einwandfreien Schlußfolgerungen führen. Diese sind: das quantitative Verhältnis zwischen a) eingeführtem Skatol und dem roten Skatoxylfarbstoff einerseits und den ausgeschiedenen gepaarten Schwefelsäuren andererseits, sowie zwischen beiden letzteren untereinander; b) zwischen präformierter Schwefelsäure und gepaarter Schwefelsäure.

Versuchsanordnung.

Ich habe fünf Versuchsreihen an zwei Hunden, und zwar drei an Tier A, einem Männchen von 15,5 kg Körpergewicht, und zwei an Tier B, einem Weibchen von 9,2 kg Körpergewicht, ausgeführt. Das Männchen war ein wohlgenährtes, das Weibchen ein stark abgemagertes Tier. Jede Versuchsreihe umfaßte eine Vor- und Nachperiode ohne Skatoldarreichung, und dazwischen wurden jeweils einige Skatoltage eingeschaltet. Obzwar *Porcher* und *Hervieux* zur sicheren Vermeidung einer Mitausscheidung von Indoxylverbindungen eine fleischlose Kost vorgeschlagen haben, war ich der Meinung, daß der größere Vorrat an Schwefelsäure, der von einer Fleischkost zu erwarten ist, die Bereitschaft des Organismus zur Schwefelsäurepaarung erhöht. Ich wählte für die ganze Versuchsdauer eine aus Pferdefleisch und Brot bestehende Nahrung, welche eben zur Konstanterhaltung des Körpergewichts ausreichte und, täglich zur gleichen Zeit verabfolgt, womöglich auf einmal verzehrt wurde. Trinkwasser erhielt das Tier A in Versuchsreihe I und II ad libitum; demselben Tiere in Versuchsreihe III und auch dem Tiere B in Versuchsreihe IV und V wurde, um eine möglichst gleichmäßige Diurese zu erzielen, das Wasser in angemessener und stets konstanter Menge durch eine Schlundsonde eingeführt. Mit dieser Ernährung wurde bereits einige Tage vor Beginn der Analysen begonnen.

Versuchsmethodik.

Verabreichung des Skatols. Das Skatol (β-Methylindol von *Schuchardt* bezogen) wurde jedesmal zu Beginn des betreffenden Skatoltages vor der Fütterung gegeben, und zwar erhielt Tier A das Skatol per os teils in kurze Darmstücke von der Gans eingeschlossen (Versuchsreihe I), teils durch Schlundsonde in Form einer Suspension, nachdem es in wenig Alkohol gelöst und die Lösung in mehr Wasser eingetragen wurde (Versuchsreihe II und III). Diese Art der Darreichung war mit Unzulänglichkeiten verbunden, indem oft weit geringere Dosen, als in

der Literatur beschrieben sind, zu Erbrechen und eventuell zum Verlust einer bereits begonnenen Versuchsserie führte. Weit einfacher gestaltete sich Versuchsreihe IV und V am Tier B, welches das Skatol in wässeriger Suspension (Herstellung wie oben) seitlich in die Rumpfgegend sukutan eingespritzt erhielt, da es die Verabreichung durch die Schlundsonde überhaupt nicht vertrug.

Sammeln und Analyse des Harns. Die Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten und der Harn in üblicher Weise gesammelt. Da trotz gleichmäßiger Nahrung und Flüssigkeitszufuhr die Tagesharnmengen stark variierten, habe ich am Weibchen, Tier B, um den Zugang zur Urethra frei zu bekommen, die Perineotomie ausgeführt und die Blase am Ende eines jeden Versuchstages (eine festgesetzte Vormittagsstunde) mittels Katheters zu entleeren gesucht. Der noch in der Blase verbliebene Rest wurde durch Waschung mit stets 100 ccm einer 3proz. Lösung von Borsäure entfernt, das Waschwasser mit dem Tagesharn vereinigt, gut vermengt und die Gesamtmenge behufs Klärung durch ein Faltenfilter gegossen. Im Sinne unseres vorangehend erwähnten Arbeitsplanes hatte ich im Harn einerseits die gesamte, präformierte und gepaarte Schwefelsäure, andererseits aber die Menge des nach *Hári* durch Kondensation mit p-Dimethylamidobenzaldehyd erzeugten Farbstoffs, dessen Alkoholkomponente Skatoxyl ist, zu bestimmen. Zu ersterem Zwecke verwendete ich das altbewährte gravimetrische Verfahren von *Salkowski*, zum letzteren Zwecke aber die von mir veröffentlichte spektrophotometrische Methode. Bezüglich ihres Prinzips und ihrer Ausführung verweise ich auf meine oben erwähnten Mitteilungen, muß aber noch folgendes hinzufügen. Im Gegensatz zum Menschenharn tritt, wenn man den erwärmten Hundeharn mit *Ehrlich*schem Reagens versetzt, die rote Farbe nicht sofort, sondern erst nach erfolgter Verdünnung mit Alkohol, Absättigung der Säure mittels Ammoniak oder Sodalösung, und nach tüchtigem Durchschütteln ein. Hierbei wird aber die Flüssigkeit trübe, weshalb sie, um spektrophotometrisch untersucht werden zu können, vorangehend zentrifugiert werden muß.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Daten aller fünf Versuchsreihen sind in der Generaltabelle am Ende des Textes zusammengestellt, und es sei nun gleich hier vorweggenommen, daß ich in Versuchsreihe I und II bloß Schwefelsäure, in Versuchsreihe III und V bloß den Farbstoff, in Versuchsreihe IV aber Schwefelsäure und Farbstoff bestimmt habe.

Schwefelsäure. Bei den großen Schwankungen, die die Schwefelsäureausscheidung insbesondere in Versuchsreihe I und II von einem Tag zum anderen aufweist, scheint es zunächst sehr schwierig, sich eine

Meinung darüber zu bilden, ob eine Zunahme stattgefunden hat oder nicht. Denn die skrupellose Rechnung mit Mittelwerten aus stark voneinander abweichenden Daten hat ja schon oft zu sehr zu bezweifelnden Ergebnissen geführt. Der Umstand jedoch, daß ich die Dauer der skatolfreien Vorperiode in allen Versuchsreihen recht lange, auf 5 bis 7 Tage, bemessen habe, macht es trotz der großen Unterschiede zwischen den Einzeldaten möglich, den aus ihnen berechneten Mittelwert als annehmbare Vergleichsbasis zu verwenden. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, die während der Skatolperiode verzeichneten Ausschläge mit den Einzeldaten der vorangehenden skatolfreien Periode zu vergleichen und dadurch festzustellen, ob eine Änderung stattgefunden hat oder nicht. Ich will die Ergebnisse der Versuchsreihen I, II und IV aus beiden Gesichtspunkten beleuchten: Die Berechnung mit den Mittelwerten hatte das in Tabelle I zusammengestellte Ergebnis geliefert.

Tabelle I.

		Gesamte Schwefelsäure als SO_3 berechnet			Gepaarte Schwefelsäure als SO_3 berechnet			Präform. Schwefelsäure als SO_3 berechnet		
		Vorperiode g	Skatolperiode g	Nachperiode g	Vorperiode g	Skatolperiode g	Nachperiode g	Vorperiode g	Skatolperiode g	Nachperiode g
Versuchsreihe	I	0,589	0,702	0,431	0,157	0,284	0,116	0,432	0,418	0,315
	II	0,711	0,832	0,598	0,153	0,275	0,167	0,540	0,521	0,426
	IV	0,497	0,585	0,505*)	0,062	0,096	0,075	0,436	0,489	0,437*)

*) Bloß ein Tag.

Ein Blick auf vorangehende Zusammenstellung genügt, um zu zeigen:

a) *daß die präformierte Schwefelsäure* in *der Skatolperiode keine* (Versuchsreihe I und II) *oder nur eine geringe* (Versuchsreihe IV) Änderung, in der Nachperiode der Versuchsreihe I und II eine erhebliche Abnahme aufweist;

b) *daß die gepaarten Schwefelsäuren in der Skatolperiode in allen drei Versuchsreihen eine sehr erhebliche Zunahme zeigten* (80 Proz. in Versuchsreihe I und II, 50 Proz. in Versuchsreihe IV), welche Zunahme in Versuchsreihe II und IV auch noch in der skatolfreien Nachperiode in geringem Grade vorhanden ist;

c) *daß die Zunahme der Gesamtschwefelsäure bloß durch die der gepaarten Schwefelsäure bedingt ist.*

Hat man Bedenken gegen die Rechnung mit den Mittelwerten und vergleicht die Einzelwerte untereinander, so kommt man zu demselben Resultat, indem sich für die gepaarte Schwefelsäuren in den einzelnen Perioden die folgenden, in Tabelle II zusammengestellten *Höchstwerte* ergeben:

Tabelle II.

	Vorperiode g	Skatolperiode g	Nachperiode g
Versuchsreihe I . . .	0,219	0,395	0,156
„ II . . .	0,188	0,365	0,218
„ IV . . .	0,072	0,097	0,084

Besonders eindrucksvoll tritt die Vermehrung der gepaarten Schwefelsäuren in Erscheinung, wenn man ihr Verhältnis zur präformierten Schwefelsäure berechnet. Die Verhältniszahl schwankt, wie aus nachstehender Tabelle III hervorgeht, zwischen folgenden Werten:

Tabelle III.

	Vorperiode g	Skatolperiode g	Nachperiode g
Versuchsreihe I . . .	2,3—3,7	1,2—2,1	2,6—2,8
„ II . . .	2,8—3,8	1,6—1,8	2,0—3,3
„ IV . . .	6,3—8,0	4,6—5,2	6,8

Es stimmen alle Versuchsreihen darin überein, *daß die Verhältniszahl in der Skatolperiode eine erhebliche Herabsetzung erfährt* zum Zeichen dessen, daß im Verhältnis zur präformierten Schwefelsäure mehr gepaarte Schwefelsäuren ausgeschieden werden. Darüber, daß die Verhältniszahl in Versuchsreihe IV eine ganz andere ist, als in Versuchsreihe I und II, braucht man sich nicht aufzuhalten; Versuchsreihe I und II wurde an einem, Versuchsreihe IV an einem anderen Tiere ausgeführt[1]).

An der gesteigerten Ausscheidung von gepaarten Schwefelsäuren in der Skatolperiode läßt sich demnach nicht zweifeln; wohl ist aber der an sich berechtigte Einwand möglich, daß es sich vielleicht nicht um eine gesteigerte Bildung, sondern um eine erhöhte Ausschwemmung handelt, denn in den meisten Versuchsreihen war eine ausgesprochene, wenn auch ungleichmäßige Steigerung der Diurese vorhanden, die bald nur den ersten, bald nur den zweiten Tag der Skatoldarreichung betraf und an Versuchsreihe I und II, wie aus der Betrachtung der Tageswerte in der Generaltabelle hervorgeht, auch mit einer Zunahme der präformierten Schwefelsäure einherging. Da jedoch die oben er-

[1]) Daß es solche individuelle Schwankungen gibt, kann auch aus Analysen von *Brieger* (Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 414, 1880) und *Liebesny* (diese Zeitschr. **105**, 46, 1920) gefolgert werden, indem ersterer ähnliche Resultate wie ich an Hund B, letzterer aber, wie ich an Hund A gefunden hat.

wähnte Verhältniszahl $\left(\frac{\text{präformierte}}{\text{gepaarte}} H_2SO_4\right)$ auch an diesen Tagen eine wesentlich niedrigere ist, läßt sich eine gleichzeitige ansehnliche Mehrbildung von gepaarten Schwefelsäuren nicht bezweifeln.

Skatoxylpaarling. Das Ergebnis der Versuchsreihe III, in der nur das Kondensationsprodukt des nach *Hári* darstellbaren Skatoxylfarbstoffs bestimmt wurde, ist durchaus unklar, denn einerseits waren die Werte der Vorperiode sehr schwankend, andererseits war am ersten Tage der Skatoldarreichung zwar eine sehr erhebliche Zunahme an Farbstoff, daneben aber auch eine mächtige Steigerung der Diurese wahrzunehmen, die am nächsten Tage von einer ebenso starken Abnahme beider gefolgt war. Immerhin ist es möglich, daß die starke Steigerung im 37. und 39. Versuche nicht von der gesteigerten Diurese allein, sondern in erheblichem Maße auch von einer nachträglichen Mehrbildung bedingt war.

Entschieden im Sinne einer Mehrbildung lassen sich die Ergebnisse der Versuchsreihen IV und V deuten, deren Mittelwerte in nachstehender Tabelle IV zusammengestellt sind. (Die skatolfreie Nachperiode der Versuchsreihe IV gilt gleichzeitig auch als Vorperiode der Versuchsreihe V.)

Tabelle IV.

	Versuchsperioden	Skatoxylfarbstoff mg
Versuchsreihe IV . .	Vorperiode	38
	Skatolperiode	45*)
	Nach- bzw. Vorperiode	39
Versuchsreihe V . .	Skatolperiode	45
	Nachperiode	40

*) Ohne das offenbar irrige Ergebnis in Versuch 48.

Die Zunahme in der Ausscheidung des Skatoxylpaarlings beträgt in beiden Versuchsreihen (IV und V) etwa 15 Proz., was insbesondere in bezug auf Versuchsreihe IV, in der sich eine Zunahme der gepaarten Schwefelsäuren um 50 Proz. ergeben hatte, recht merkwürdig ist.

Findet nämlich eine Paarung des eingeführten und zu Skatoxyl oxydierten Skatols mit Schwefelsäure statt, so müßte die Zunahme der Schwefelsäure und des Skatoxylpaarlings eine zumindest gleich große sein: Tatsächlich aber nimmt erstere dreimal so stark zu. Ich bin nicht in der Lage, eine sichere Erklärung dieser Erscheinung zu geben; denn es gibt der Erklärungen gar viele. So ist es möglich, daß der von *Hári* beschriebene Kondensationsprozeß mit p-Dimethylamidobenzaldehyd kein quantitativer ist, daher auch das von mir ausgearbeitete

quantitative Verfahren nur Minimalwerte liefert. Andererseits haben möglicherweise die früheren Autoren recht in ihrer Annahme, daß ein Teil, vielleicht ein großer Anteil des eingeführten Skatols, nicht in Skatoxylschwefelsäure, sondern in Indoxylschwefelsäure verwandelt im Harn erscheint. Hier sei noch erwähnt, daß auch ein grüner Farbstoff von *Benedicenti*[1]) eine Rolle spielen kann, den er im Harn von Hunden nach Darreichung von methylierten Indolpräparaten wahrgenommen hat, wenn er den Harn an der Luft stehen ließ. Hatte er nur wenig Methylindol injiziert, so entstand bloß viel rotes Pigment, welches auch nach seiner Meinung Methylindoxylschwefelsäure wäre; hingegen trat nach großen Dosen eine starke Grünfärbung ein. Auch der Harn meiner Hunde zeigte an den Skatoltagen eine ausgesprochene grüne Farbe.

Wie dem nun sei, ist durch *Háris* und meine vorangehenden Arbeiten mit größter Wahrscheinlichkeit bewiesen, daß in Menschen- und Hundeharn Skatoxyl-(schwefelsäure) enthalten ist, durch gegenwärtige Arbeit aber sichergestellt, daß die Menge der gepaarten Schwefelsäuren durch Einfuhr von Skatol erhöht werden kann.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *P. Hári* ausgeführt.

Generaltabelle.

Versuchsreihe I.

Hund A. Täglich 300 g Fleisch, 300 g Brot; Wasser ad libitum.

Versuchs-Nr.	Datum des Versuchs 1926	Harnmenge einschl. 100 ccm Waschwasser	Schwefelsäure als SO_3 berechnet							Bemerkungen
			gesamte		gepaarte		präformierte		präform. / gepaarte	
			Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g		
1	20.–21. III.	255	0,189	0,4814	0,0397	0,1012	0,149	0,3802	3,7	
2	21.–22. III.	380	0,162	0,6148	0,0448	0,1702	0,117	0,4446	2,6	
3	22.–23. III.	333	0,158	0,5275	0,0477	0,1588	0,111	0,3687	2,3	
4	23.–24. III.	290	0,197	0,5722	0,0524	0,1520	0,145	0,4202	2,8	
5	24.–25. III.	240	0,181	0,4344	0,0511	0,1224	0,130	0,3120	2,5	
6	25.–26. III.	360	0,174	0,6278	0,0485	0,1746	0,126	0,4532	2,6	
7	26.–27. III.	420	0,207	0,8674	0,0522	0,2194	0,154	0,6480	2,9	
8	27.–28. III.	260	0,208	0,5395	0,0663	0,1726	0,141	0,3669	2,1	0,5 g Skatol per os
9	28.–29. III.	460	0,188	0,8648	0,0858	0,3947	0,102	0,4701	1,2	1,0 g Skatol per os
10	29.–30. III.	150	0,180	0,2708	0,0505	0,0758	0,129	0,1950	2,6	
11	30.–31. III.	325	0,182	0,5918	0,0479	0,1558	0,134	0,4360	2,8	

[1]) *Benedicenti*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**, 181, 1907.

Versuchsreihe II.

Hund A. Täglich 300 g Fleisch, 300 g Brot; Wasser ad libitum.

Versuchs-Nr.	Datum des Versuchs 1926	Harnmenge einschl. 100 ccm Waschwasser	Schwefelsäure als SO_3 berechnet: gesamte Proz.	gesamte g	gepaarte Proz.	gepaarte g	präformierte Proz.	präformierte g	präform. / gepaarte	Bemerkungen
12	12.-13. V.	385	—	—	0,0464	0,1788	—	—	—	
13	13.-14. V.	320	0,221	0,7078	0,0539	0,1726	0,167	0,5352	3,1	
14	14.-15. V.	344	0,206	0,7076	0,0433	0,1489	0,162	0,5587	3,8	
15	15.-16. V.	338	0,188	0,6341	0,0471	0,1592	0,141	0,4749	3,0	
16	16.-17. V.	235	—	—	0,0466	0,1120	—	—	—	
17	17.-18. V.	415	0,190	0,7893	0,0447	0,1854	0,146	0,6039	3,3	
18	18.-19. V.	145	—	—	0,0519	0,0752	—	—	—	
19	19.-20. V.	390	0,184	0,7157	0,0482	0,1879	0,135	0,5278	2,8	
20	20.-21. V.	530	0,190	1,0070	0,0689	0,3649	0,121	0,6421	1,8	1,0 g Skatol per os (bei Nacht teilweise erbrochen)
21	21.-22. V.	310	—	—	0,0650	0,2014	—	—	—	0,7 g Skatol per os
22	22.-23. V.	375	0,176	0,6581	0,0688	0,2581	0,107	0,4000	1,6	0,8 g Skatol per os
23	23.-24. V.	330	0,198	0,6545	0,0661	0,2182	0,132	0,4363	2,0	
24	24.-25. V.	265	0,204	0,5411	0,0476	0,1262	0,157	0,4149	3,3	
25	25.-26. V.	315	—	—	0,0502	0,1583	—	—	—	

Versuchsreihe IV.

Hund B, tägl. 250 g Fleisch, 200 g Brot, 250 ccm Wasser (durch Schlundsonde).

Versuchs-Nr.	Datum des Versuchs 1926	Harnmenge einschl. 100 ccm Waschwasser	Schwefelsäure als SO_3 berechnet: gesamte Proz.	gesamte g	gepaarte Proz.	gepaarte g	präformierte Proz.	präformierte g	präform. / gepaarte	*Hári*scher Skatoxylfarbstoff g
41	30. VI.—1. VII.	435	—	—	—	—	—	—	—	0,0366
42	1.- 2. VII.	380	—	—	—	—	—	—	—	0,0342
43	2.- 3. VII.	590	—	—	—	—	—	—	—	0,0429
44	3.- 4. VII.	425	—	—	—	—	—	—	—	0,0420
45	4.- 5. VII.	445	0,117	0,5223	0,0162	0,0720	0,101	0,4503	6,3	0,0398
46	5.- 6. VII.	490	0,096	0,4710	0,0107	0,0524	0,085	0,4186	8,0	0,0355
47	6.- 7. VII.	465	0,107	0,4989	0,0131	0,0609	0,094	0,4380	7,2	0,0322
48	7.- 8. VII.	575	—	—	—	—	—	—	—	(0,0226) *)
49	8.- 9. VII.	425	0,149	0,6328	0,0223	0,0947	0,117	0,5381	5,2	0,0421 **)
50	9.-10. VII.	475	0,121	0,5733	0,0201	0,0958	0,101	0,4775	5,0	0,0451 †)
51	10.-11. VII.	480	0,114	0,5478	0,0203	0,0973	0,094	0,4505	4,6	0,0479 ††)
52	11.-12. VII.	560	—	—	—	—	—	—	—	0,0468
53	12.-13. VII.	390	—	—	0,0214	0,0836	—	—	—	0,0401
54	13.-14. VII.	355	0,142	0,5054	0,0186	0,0659	0,124	0,4395	6,8	0,0390
55	14.-15. VII.	345	—	—	—	—	—	—	—	0,0361
56	15.-16. VII.	340	—	—	—	—	—	—	—	0,0349

*) 0,6 g Skatol per os (in den Nachmittagsstunden erbrochen).
**) 0,25 g Skatol subkutan.
†) 0,3 g „ „
††) 0,3 g „ „

Versuchsreihe III.

Hund A, tägl. 300 g Fleisch, 300 g Brot, 300 ccm Wasser (durch Schlundsonde).

Versuchs-Nr.	Datum des Versuchs 1926	Harnmenge einschl. 100 ccm Waschwasser	*Hári*scher Skatoxylfarbstoff g	Bemerkungen
26	23.—24. V.	490	0,0692	
27	24.—25. V.	505	0,0744	
28	25.—26. V.	400	0,0400	
29	26.—27. V.	525	0,0790	
30	27.—28. V.	450	0,0638	
31	28.—29. V.	320	0,0387	
32	29.—30. V.	580	0,0796	0,8 g Skatol per os (b. Nacht teilweise erbrochen)
33	30.—31. V.	175	0,0182	0,5 g Skatol per os
34	31. V.—1. VI.	625	0,0604	0,5 g " " "
35	1.— 2. VI.	450	0,0482	
36	2.— 3. VI.	345	0,0487	
37	3.— 4. VI.	550	0,0976	
38	5.— 6. VI.	330	0,0528	
39	6.— 7. VI.	415	0,1078	
40	7.— 8. VI.	245	0,0494	

Versuchsreihe V.

Hund B, tägl. 250 g Fleisch, 250 g Brot, 250 ccm Wasser (durch Schlundsonde).

Versuchs-Nr.	Datum des Versuchs 1926	Harnmenge einschl. 100 ccm Waschwasser	*Hári*scher Skatoxylfarbstoff g	Bemerkungen
52	11.—12. VII.	560	0,0468	
53	12.—13. VII.	390	0,0401	
54	13.—14. VII.	355	0,0390	
55	14.—15. VII.	345	0,0361	
56	15.—16. VII.	340	0,0349	
57	16.—17. VII.	390	0,0393	0,3 g Skatol subkutan
58	17.—18. VII.	470	0,0470	0,4 g " "
59	18.—19. VII.	493	0,0494	0,3 g " "
60	19.—20. VII.	425	0,0472	
61	20.—21. VII.	440	0,0440	
62	21.—22. VII.	430	0,0395	
63	22.—23. VII.	310	0,0363	
64	23.—24. VII.	385	0,0359	
65	24.—25. VII.	360	0,0358	

Zur Kenntnis des Fichtenholzlignins.

Von

Erik Hägglund und T. Rosenqvist.

(Aus dem Institut für Holzchemie der Akademie zu Åbo, Finnland.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1926).

Schon früher hat der eine von uns (*Hägglund*) in einer Arbeit zusammen mit *C. B. Björkman*[1]) eine besondere Eigenschaft des sogenannten Salzsäurelignins, welches von hydrolysierbaren Kohlehydraten völlig befreit war, aufmerksam gemacht, nämlich, daß dieses Lignin bei der *Tollens*schen Destillation ein alkohollösliches Phloroglucid lieferte, das große Ähnlichkeit mit dem Methyl- und Oxymethylphloroglucid zeigte, aber bei näherer Untersuchung nicht mit diesen Substanzen identisch war. Die Frage erschien aber so wichtig, daß es zweckmäßig erschien, die Sache nochmals nachzuprüfen. Zu diesem Zwecke wurde in bekannter Weise hergestelltes Salzsäurelignin mit 12proz. Salzsäure nach *Tollens* destilliert[2]). Die Ausbeute an Phloroglucid bei den verschiedenen Versuchen war wie folgt. Die Hauptmenge der Fällung entstand in den ersten 200 ccm Destillat. (Vier Fraktionen zu je 100 ccm wurden aufgenommen.)

Lignin g	Phloroglucid g	Als „Furfurol" berechnet Proz.
5,1124	0,1928	2,17
3,2320	0,1690	2,98
5,6136	0,2722	2,80

Außer mit Phloroglucin wurde das Destillat mit Barbitursäure und Thiobarbitursäure gefällt,

Lignin g	Barbitursäure-Kondensationsprodukt g	Als „Furfurol" berechnet Proz.
3,3070	0,1900	2,76

[1]) Diese Zeitschr. 147, 74, 1924.

[2]) Das Salzsäurelignin wurde durch Behandlung von feinen, mit Äther und Aceton erschöpfend extrahierten Fichtenholzspänen mit 45proz. Salzsäure während 24 Stunden erhalten. Die Ausbeute betrug, bezogen auf aschefreies, trockenes Holz, 29,3 Proz.

Lignin g	Thiobarbitursäure-Kondensationsprodukt[1]) g	Als „Furfurol" berechnet Proz.
2,9734	0,2456	3,58

Auch mit Phenylhydrazin wurde eine Fällung erhalten, die aber nicht im kristallinischen Zustand erhalten werden konnte. Die Destillation wurde in dem Falle mit Schwefelsäure (40 ccm konzentrierte Schwefelsäure + 140 ccm Wasser) vorgenommen, das Destillat mit Essigsäure angesäuert und darauf mit Phenylhydrazin in 50proz. Essigsäure versetzt. Die dabei zunächst erhaltene gelbe Emulsion ging nach und nach in einen roten Niederschlag über. Es zeigte sich, daß Methyl- und Oxymethylfurfurol in ähnlicher Weise reagierten.

Um die flüchtige Substanz zu identifizieren, wurde eine Anzahl qualitativer Prüfungen vorgenommen.

Furfurol konnte wegen der Farbe der Phloroglucidfällung nicht in Frage kommen. Das Phloroglucid war rotbraun, teilweise in Alkohol löslich. Um die Anwesenheit von *Methylfurfurol* zu prüfen, wurden folgende Reaktionen vorgenommen.

Mit Resorcinsalzsäure: negatives Ergebnis, keine Rotfärbung. Einige Kubikzentimeter des Destillats wurden mit einer Alkohol-Schwefelsäuremischung (3 : 1) auf dem Wasserbad erhitzt. Keine Grünfärbung! Einige Kubikzentimeter des Destillats wurden mit 2 ccm Aceton und 10 ccm konzentrierter Salzsäure 10 Minuten erwärmt. Bei Anwesenheit von Methylfurfurol soll die Lösung ein Absorptionsband, das die *D*-Linie deckt, geben. Die Versuche gaben durchweg negative Ergebnisse. Eine Vergleichsprüfung mit Isodulcit gab ein deutliches Absorptionsband. Um die Anwesenheit von *Oxymethylfurfurol* zu prüfen, wurde die Reaktion von *Seliwanoff* benutzt: Erhitzung mit Resorcin und Salzsäure. Die Prüfung fiel negativ aus.

Ebensowenig gelang es, ω-Brommethylfurfurol nachzuweisen, um dadurch die Anwesenheit von Oxymethylfurfurol festzustellen. Der Versuch wurde folgendermaßen ausgeführt. 10 g Lignin wurden mit 250 ccm bei 0° mit Bromwasserstoff gesättigtem Chloroform in einer Druckflasche während 2 Stunden auf 62° gehalten und darauf abgekühlt. Nach einigen Stunden wurde mit Soda neutralisiert. Bei der Behandlung wurde das Lignin schwarz. Die Hauptmenge des Chloroforms wurde abdestilliert. Der letzte Rückstand des Chloroforms wurde im Vakuum abgedampft. Dabei hinterblieb ein ganz geringer Rückstand, eine braune, halbfeste Masse, worin ω-Brommethylfurfurol nicht nachgewiesen werden konnte.

[1]) Vgl. Journ. Amer. Chem. Soc. 38, 2156 (1916).

Auch die Destillate bei der Destillation des Lignins mit Salzsäure und Schwefelsäure gaben keine Reaktionen auf Oxymethylfurfurol.

Im Anschluß an diese Versuche wurde untersucht, ob im Fichtenholz selbst *Methylpentosen* vorhanden sind.

Versuch 1. 39,7 g absolut trockenes Holz wurde mit 2proz. Schwefelsäure 2 Stunden bei 120° im Autoklaven erhitzt. Das Gewicht des Rückstands betrug 28,67 g; 27,7 Proz. des Holzes sind demnach in Lösung gegangen. Die Zuckerlösung wurde mit $BaCO_3$ neutralisiert und mit Knochenkohle entfärbt. Die Lösung wurde zu einem Sirup eingedampft. Der Zucker wurde mit Aceton und Salzsäure behandelt. Ein Absorptionsband erhielt man nicht (vgl. oben).

Ein Kontrollversuch gab dasselbe negative Ergebnis.

Versuch 2. Sulfitablauge wurde unter Anwendung von Pergamenthülsen dialysiert. Auf diese Weise wurden die Zuckerarten von den Ligninverbindungen getrennt. Der Zucker zeigte keine Methylpentosanreaktion.

Methylpentosen wurden also weder im Salzsäurelignin noch im Fichtenholz gefunden.

Außer dem Salzsäurelignin wurde auch das sogenannte Alkalilignin untersucht. Dieses Lignin haben wir in folgender Weise hergestellt.

Als Ausgangsmaterial diente Fichtenholz, in kleine, gleich große Stücken geschnitten. Das Holz wurde mit Natronlauge (27 g NaOH auf 100 g Holz bezogen) während 5 Stunden bei 165° aufgeschlossen. Nach beendetem Kochen wurde die Lauge von dem Zellstoff abgeschieden. Das Alkalilignin wurde durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure bei einer Temperatur von 60° ausgefällt, abfiltriert und so lange mit Wasser gewaschen, bis keine H_2SO_4-Reaktion des Wassers mehr eintrat; das letzte Filtrat war dabei braun gefärbt. Die Trocknung geschah bei 100° im Trockenschrank. Das Alkalilignin bestand aus einem braun gefärbten Pulver mit angenehmem Vanillegeruch. Das Produkt war größtenteils in Aceton löslich. Aus der Acetonlösung konnte es mit Äther ausgefällt werden, wenn die Lösung in einen großen Überschuß von Äther eingetragen wurde, und zwar als eine hellbraune, flockige Fällung, die leicht abfiltriert werden konnte. Das Lignin wurde mit Äther während 36 Stunden extrahiert, wobei 3,25 Proz. des Gewichts in Lösung ging. Der Gehalt an Methoxyl wurde bestimmt und betrug 15,4 Proz., auf aschefreie Substanz bezogen.

Das Alkalilignin wurde nach *Tollens* mit 12proz. Salzsäure destilliert, wobei das Destillat in vier Fraktionen von je 100 ccm aufgenommen wurde. In den beiden ersten trat durch Zusatz von Phloroglucin eine *grünschwarze* Fällung ein, während die beiden übrigen klar blieben.

Alkalilignin g	Phloroglucid g	„Furfurol" des Lignins Proz.
5,2740	0,0320	0,34
4,5374	0,0243	0,31
5,3262	0,0356	0,38

Ein Teil des Phloroglucids war alkohollöslich. Die alkoholunlösliche grünschwarze Substanz rührte wahrscheinlich von *Pentosan* her, das nicht völlig aus dem Verbande mit dem Lignin abgespalten war.

Wir sehen also, daß das Salzsäurelignin wesentlich mehr furfurolähnliche Substanzen abgibt als das Alkalilignin. Auch ein qualitativer Unterschied ist deutlich. Es liegt wohl nahe anzunehmen, daß die Ursache dafür darauf zurückzuführen ist, daß das Lignin durch die Alkalibehandlung verändert wird oder vielmehr einen Anteil verloren hat, welcher als besonderer Träger der betreffenden Reaktion anzusehen ist. In der Tat ist auch die Ausbeute von Alkalilignin auf das Holzgewicht bezogen, geringer als die Ausbeute von Salzsäurelignin[1]). Man könnte vielleicht den Einwand erheben, daß die starke Reaktion seitens des Salzsäurelignins auf Umlagerung des Ligninmoleküls zurückzuführen wäre. Aber dagegen sprechen andere Ergebnisse. Schon vor längerer Zeit zeigten *C. G. Schwalbe* und *E. Becker*[2]), daß Fichtenholz bei der *Tollens*schen Destillation (und auch Kiefer) bedeutende Mengen eines alkohollöslichen Phloroglucids geben. Die Verfasser meinten, es handelte sich hier um Methylfurfurol-Phloroglucid. Das Methylfurfurol wäre aus Methylpentosan entstanden. Es zeigte sich, daß Laubhölzer verhältnismäßig wenig solches Phloroglucid gaben. Das wurde auch durch neue Untersuchungen bestätigt. Wir führen folgende Zahlen von *Schwalbe* und *Becker*[3]) an:

Prozente des wasserfreien Holzes.

	Fichte	Kiefer	Buche	Birke	Pappel	Erle
Methylpentosan	3,00	2,23	1,02	0,84	0,72	0,00

Es ist nunmehr bekannt, daß cellulosehaltige Materialien bei der *Tollens*schen Destillation auch zur Bildung von Oxymethylfurfurol Anlaß geben. Das Phloroglucid der letzteren Substanz zeichnet sich auch durch eine gewisse Alkohollöslichkeit aus. Infolgedessen dürften die oben angegebenen Zahlen etwas zu hoch sein. Es ist aber offenbar,

[1]) *E. Hägglund*, Cellulosechemie 5, 81, 1924.
[2]) Zeitschr. f. angew. Chem. 32, 320, 1919.
[3]) *Schwalbe* und *Becker*, ebendaselbst 33, 15, 1920.

daß man dadurch die außerordentlich hohe „Methylpentosan“ Ausbeute bei Fichte (und Kiefer) nicht erklären kann.

Nun haben wir zu voller Evidenz nachgewiesen, daß das Fichtenholz kein Methylpentosan oder, richtiger gesagt, keine Methylfurfurol liefernde Substanzen enthält. Es ist also deutlich, daß die Ursache zur Bildung eines alkohollöslichen Phloroglucids auf die Eigenschaft des Fichtenholzlignins zurückzuführen ist. Durch die Einwirkung der hochkonzentrierten Salzsäure auf das Holz ist also die oben erwähnte Eigenschaft des Salzsäurelignins nicht entstanden; möglicherweise wird sie aber geschwächt. Diese Eigenschaft ist, wie es scheint, nicht dem Anteil eigen, der unter dem Namen α-Lignin geht. Lignosulfosäure, die über die β-Naphthylaminverbindung isoliert und rein dargestellt wurde, gab nämlich bei der *Tollens*schen Destillation keine mit Phloroglucin kondensierende flüchtige Substanz ab[1]). Es ist natürlich nicht völlig von der Hand zu weisen, daß die Sulfonierung des Lignins möglicherweise die besprochene Aufspaltung mit Salzsäure verhindert.

Für die Pentosanbestimmung im Holze oder anderen ligninhaltigen Fasern sind die oben erwähnten Ergebnisse von Bedeutung. Da das Lignin also bei der *Tollens*schen Destillation flüchtige Substanzen gibt, die ähnlich dem Furfurol oder Methylfurfurol mit Phloroglucin oder Barbitursäure reagieren, ist es offenbar, daß man bei der Pentosanbestimmung solcher Substanzen zu hohe Werte erhält. Wie groß die Korrektion ist, die dabei anzubringen ist, kann noch nicht völlig exakt angegeben werden.

Im Anschluß an diese Untersuchungen haben wir einige Resultate von *A. Friedrich* und *J. Diwald*[2]) nachgeprüft, da diese nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Forschungen im hiesigen Institut standen. Nach unserer Auffassung läßt es sich nicht vermeiden, daß ein Teil der Methoxylgruppen des Lignins bei der Isolierung desselben abgespalten wird; das ist bei dem Aufschluß mit Alkalien, sauren Sulfiten und Säuren immer der Fall. Nun meinen die Autoren, daß eine von *Grüss*[3]) angegebene Darstellungsweise des Lignins ein wesentlich anderes Ergebnis zeigt, indem es auf diese Weise gelingen soll, ein Lignin mit 20,9 Proz. Methoxyl darzustellen. Dieses Lignin wird „Primärlignin“ genannt. Wir verfuhren genau nach der Vorschrift von *Friedrich* und *Diwald* folgendermaßen.

Fein gesiebte Sägespäne von Fichtenholz wurden in einem *Soxhlet*-Apparat mit einer Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Benzol

---

[1]) Diese Feststellung verdanken wir Herrn Assistent *B. Troberg*.
[2]) Monatsh. f. Chem. **46**, 31, 1925.
[3]) Ber. d. bot. Ges. **38**, 361, 1920; ref. Centralbl. **1921**, **II**, **979**.

während 7 Stunden extrahiert. Darauf wurde mit der 50fachen Menge kalter 5proz. Natronlauge extrahiert. Nach 36 Stunden wurde die Lauge abdekantiert, worauf eine gleiche Quantität 5proz. Natronlauge zugesetzt wurde. Die Behandlung wurde viermal, 36 Stunden lang, wiederholt. Darauf wurde mit kaltem Wasser, verdünnter Essigsäure und zum Schluß mit heißem Wasser gewaschen. Die Späne wurden dann in der Luft getrocknet. Nachher wurden sie mit der gleichen Gewichtsmenge 17proz. Salzsäure zusammen gerieben, die Mischung läßt man 48 Stunden stehen. Die mit Salzsäure gemischten Späne wurden während 8 bis 10 Stunden zusammen mit der zehnfachen Menge 95proz. Alkohols unter Rückfluß gekocht. Die Späne wurden dann abfiltriert, und von dem Filtrat zwei Drittel des Alkohols abdestilliert. Der Rest wurde in die zehnfache Menge mit Salzsäure etwas angesäuerten Wassers eingegossen, wobei das Lignin in hellbraunen Flocken ausfiel. Das Lignin wurde abfiltriert, in Alkohol gelöst und wiederum mit Wasser ausgefällt, um gereinigt zu werden.

In dieser Weise hergestelltes „Primärlignin" wurde in bekannter Weise mit Jodwasserstoffsäure unter Anwendung von alkoholischer Silbernitratlösung in der Vorlage behandelt, um den Gehalt an Alkoxyl zu bestimmen.

Lignin mg	AgJ mg	Berechnet als CH_3O mg	Proz. CH_3O im Lignin
130,0	212,0	28,00	21,54
80,0	130,6	17,25	21,56

Wurde aber als Vorlageflüssigkeit statt alkoholischer Silbernitratlösung 10proz. Lösung von Trimethylamin in absolutem Alkohol verwendet, bekamen wir folgende Ergebnisse.

Lignin mg	$(CH_3)_4NJ$ mg	Proz. CH_3O im Lignin
130,2	104,2	12,4
167,6	135,8	12,5

Um diese Abweichungen zu erklären, liegt es nahe, anzunehmen, daß bei dem Kochen mit alkoholischer Salzsäure eine Alkoholyse eintritt, wie *Holmberg*[1]) bei ähnlicher Arbeitsweise gefunden hat. Der Unterschied 9,1 Proz. ist also nicht Methoxyl, sondern Äthoxyl. Bei der Umrechnung ergibt sich also statt dieser Zahl *13,2 Proz.* C_2H_5O.

[1]) Svensk Kemisk Tidskrift 37, 189, 1925.

Um die Äthoxylgruppe nachzuweisen, wurde eine weitere Jodwasserstoffdestillation vorgenommen, wobei reines Dimethylanilin als Vorlage diente. Die Fällung wurde nach 12 Stunden abfiltriert. In dem Filtrat kristallisierte die Äthylverbindung aus. Die Kristalle wurden in Alkohol gelöst und mit Äther wieder ausgefällt. F. = 126°.

Bei der Behandlung des Holzes mit alkoholischer Salzsäure ist also eine Alkoholyse eingetreten. Dadurch hat das Gewicht des Lignins zugenommen. Bezogen auf das nicht verätherte Lignin ist der wahre Methoxylgehalt nicht 12,45 Proz., sondern 14,0 Proz., was mit früheren Resultaten recht gut übereinstimmt.

K. Kürschner[1]) hat kürzlich die Aufsehen erregende Angabe gemacht, daß es ihm gelungen ist, nicht weniger als 60 Proz. des Lignins in Vanillinsäure neben kleinen Mengen Vanillin durch Sublimation überzuführen. Er arbeitete aber mit sehr kleinen Substanzmengen. Wir haben nun den Versuch gemacht, gewisse Mengen von Lignin zu sublimieren. 1 g Salzsäurelignin wurde in dünner Schicht in einem Silberschiff ausgebreitet und in einem Rohre zu 200° im elektrischen Ofen erhitzt. Während des Versuchs wurde ein schwacher Strom von Stickstoff durch das Rohr und weiter in einen eisgekühlten Glaskolben geleitet. Wir konnten bei wiederholten Versuchen keine Vanillinsäure nachweisen, obwohl Vanillingeruch deutlich wahrnehmbar war. Mit einem einfachen Apparat, dem *Kürschner*schen ähnlich, wurden mit demselben Ligninpräparat geringe Mengen von Vanillinsäurekristallen erhalten. Vanillin bzw. Vanillinsäure entsteht also durch Sublimation, aber die Ausbeute ist schwer zu bestimmen, da nur Mikroversuche positives Resultat geben. Die Mengen auf Lignin bezogen, sind nach unserer Auffassung gering.

Zusammenfassung.

1. Bei der Destillation von Salzsäurelignin mit 12proz. Salzsäure nach *Tollens* wird eine flüchtige Substanz erhalten, die mit Furfurol, Methylfurfurol oder Oxymethylfurfurol eine gewisse Ähnlichkeit zeigt, aber mit diesen Substanzen nicht identisch ist. Die Ausbeute bei unseren Versuchen betrug rund 3 Proz. des Ligningewichts, wenn die Substanz als Furfurol berechnet wird. Durch diese Eigenschaft des Lignins gibt die übliche Bestimmungsmethode von Pentosan in ligninhaltigen Stoffen zu hohe Werte.

2. Aus Alkalilignin können ebenfalls geringe Mengen mit Salzsäure flüchtige Substanzen erhalten werden, die sich mit Phloroglucin kon-

[1]) *Ahrens-Herz*, Sammlung chemischer und chemisch-technischer Vorträge 28, 147, 1925.

densieren. Dabei tritt im Gegensatz zum Salzsäurelignin Furfurol auf, was auf die Anwesenheit von Pentosan zurückgeführt werden kann. Die mit β-Naphthylamin fällbare Lignosulfosäure gibt bei der Salzsäurebehandlung keine flüchtigen, sich mit Phloroglucin kondensierende Stoffe ab.

3. Methylpentosane sind weder in Fichtenholz, noch im Lignin dieses Holzes enthalten.

4. Das sogenannte Primärlignin von *A. Friedrich* enthält Äthoxylgruppen, die bei der Alkoholyse des Holzes vom Lignin aufgenommen sind.

5. Das Lignin gibt bei der Sublimation nur kleine Mengen Vanillinsäure bzw. Vanillin.

Versuche über den Stoffwechsel von Gewebsexplantaten und deren Wachstum bei Sauerstoff- und Glucosemangel.

Von

Franz Wind.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die an diesem Institut ausgeführten Arbeiten[1]) ließen an die Möglichkeit denken, daß Geschwulstgewebe ohne Sauerstoff leben könne. Davon ausgehend, zeigte *Okamoto*[2]), daß tierische Tumoren die Fähigkeit besitzen, mehrere Tage in vitro unter anaeroben Bedingungen zu existieren; ob sie unter diesen Bedingungen auch wachsen können, ließ sich bei seiner Versuchsanordnung nicht entscheiden. Mit der Frage des anaeroben Wachstums von Geschwülsten habe ich mich, auf Vorschlag von Herrn *O. Warburg*, beschäftigt, wobei ich mich der *Harrison-Carrel*schen Methode[3]) der Züchtung von Geweben bediente. Herrn *A. Fischer*, der mir diese Methoden in liebenswürdigster Weise in seinem Laboratorium gezeigt hat, sage ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank.

Die Beziehungen, die nach den oben angeführten Arbeiten[1]) zwischen dem pathologischen Wachstum und dem Wachstum der Jugend bestehen, machten bei dem Studium des Wachstums der Tumoren Untersuchungen an normalem embryonalen und reifen Gewebe notwendig, um so mehr, als auch bei diesem der Zusammenhang zwischen Wachstum und Sauerstoffmangel bisher wenig bekannt ist.

[1]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 334, 1923; **152**, 309, 1924; Klin. Wochenschrift Nr. 12, 1925.

[2]) *J. Okamoto*, diese Zeitschr. **162**, 52, 1925.

[3]) *R. G. Harrison*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **4**, 140, 1907; Anat. Rec. **6**, 181, 1912; *A. Carrel*, Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmeth., Berlin 1912; Journ. of exp. Med. **13**, 387, 1911; **14**, 287, 1913 u. a.; *A. Fischer*, Tissue Culture. Kopenhagen 1925.

Wenn Gewebe ohne Sauerstoff wachsen kann, so entsteht die Frage nach der Reaktion, die ihm die Energie zum Wachstum liefert. Von der Annahme ausgehend, daß es die Gärung sei, habe ich Versuche über die Abhängigkeit des Wachstums vom Glucosegehalt des Kulturmediums gemacht.

Schließlich schien es wünschenswert, neben der morphologischen Betrachtung zur Beurteilung des Zustandes der Explantate und der Verhältnisse in dem sie umgebenden Medium ein Mittel zu besitzen, das eine zahlenmäßige Bewertung erlauben könnte. Zu diesem Zwecke habe ich Stoffwechselmessungen vorgenommen, wobei ich die Veränderung des Gehalts an Milchsäure, Glucose und Bicarbonat im Kulturmedium bestimmte, sowie vergleichende manometrische Stoffwechselmessungen an Explantaten, die unter verschiedenen Bedingungen gewesen waren, ausführte.

Einteilung der Arbeit.

I. Versuchsmaterial.
II. Stoffwechseluntersuchungen.
III. Anaerobes Wachstum.
IV. Wachstum in glucosearmem Medium.
V. Hefe.
VI. Protokolle.

I. Versuchsmaterial.

Als Versuchsmaterial diente das Roussarkom, das nach der von *A. Fischer* angegebenen Methode[1]) monatelang als Deckglaskultur gezüchtet wurde. Von normalen Geweben verwandte ich Kulturen von Fibroblasten [nach *Carrel* und *Ebeling*[2])] und Irisepithel [nach *A. Fischer*[3])], außerdem längere Zeit überpflanzte Explantate von Milz und Monocyten [nach *Carrel*[4])] des erwachsenen Huhnes, sowie frisch aus dem Tiere entnommenes oder nur vor kurzer Zeit explantiertes Gewebe (z. B. Tumor, embryonales Herz).

Als Kulturmedium benutzte ich im allgemeinen embryonalen Gewebssaft und Plasma des Huhnes (zu gleichen Teilen, nach *Carrel*); zuweilen fand die *Ebeling*sche Mischung[5]) (Embryonaler Gewebssaft, Serum und Fibrinogen) Verwendung.

Das Gewebe wurde als Deckglaskultur oder in Carrelschalen[6]) (z. B. Monocyten) gezüchtet.

---

[1]) *A. Fischer*, C. r. Soc. de Biol. **90**, 1181, 1924.
[2]) *A. Carrel* und *A. Ebeling*, ebendaselbst **90**, 410, 1924.
[3]) *A. Fischer*, Journ. of exp. Med. **35**, 367, 1922.
[4]) *A. Carrel* und *A. Ebeling*, ebendaselbst **36**, 365, 1922.
[5]) *A. Ebeling* ebendaselbst **33** 641, 1921.
[6]) *A. Carrel*, ebendaselbst **38**, 407, 1923.

II. *Stoffwechseluntersuchungen.*

1. Bicarbonatbestimmung.

Peyton Rous[1]) hat durch Zusatz von Lackmus zum Kulturmedium gezeigt, daß die Umgebung der Explantate von Roussarkom rasch sauer wird und daß die Diffusion im Plasmakoagulum äußerst langsam vor sich geht. Um ein Maß für die Veränderung in der nächsten Umgebung der Explantate zu gewinnen, habe ich in der verflüssigten Zone (die sich während des Wachstums um das Gewebsstück im Kulturmedium bildet) Bicarbonatbestimmungen vorgenommen.

Die Flüssigkeit aus mehreren (vier bis fünf) Kulturen wurde mit einer Kapillarpipette (s. Abb. 1) durch Bewegung der Schraube ohne Luftblasen aufgesogen, so daß die gesamte Kapillare (deren Inhalt 20 bis 30 cmm betrug) gefüllt war; die Flüssigkeit grenzte dann nur an den beiden dünnen Kapillarenden an Luft, und es trat auch nach mehreren Stunden keine meßbare Verdunstung ein.

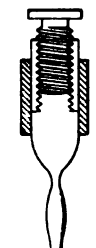


Abb. 1.

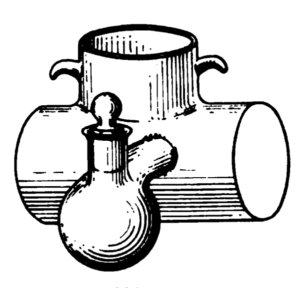


Abb. 2.

Der Inhalt der Pipette wurde in den Ansatz eines kleinen Manometergefäßes (Abb. 2) eingewogen, in den Hauptraum 0,2 ccm n/100 Weinsäure und 0,3 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung gebracht und das Bicarbonat als Kohlensäure, die durch Ansäuern aus dem Bicarbonat entwickelt wurde, nach *O. Warburg* manometrisch gemessen[2]). Bei

---

[1]) *P. Rous*, Journ. of exper. Med. **18**, 186, 1913.

[2]) *E. Negelein*, diese Zeitschrift **158**, 134, 1925. Bei der Bicarbonatbestimmung in größeren Flüssigkeitsmengen werden 0,5 bis 1 ccm der Flüssigkeit in den Hauptraum und 0,2 ccm Säure in das Ansatzgefäß gebracht. Die Änderung der Anordnung ist hier durch die kleine Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit und die geringen manometrischen Ausschläge bedingt.

Bringt man nämlich die 10 mg Flüssigkeit in den Hauptraum, so müssen sie, um ein Einkippen zu ermöglichen, auf etwa 0,5 ccm aufgefüllt, also auf das 50fache verdünnt werden, was eine Steigerung der Dissoziation der Alkaliproteinate bewirkt. Ferner macht sich die Änderung der Löslichkeit der Gase, die bei der Ansäuerung der Flüssigkeit eintritt und die sonst wegen ihrer Geringfügigkeit vernachlässigt werden kann, hier bei den geringen Ausschlägen doch geltend. Schließlich spielt die Alkalität des Glases bei der Ansäuerung der großen Oberfläche des Hauptgefäßes eine Rolle. Die genannten Umstände bewirken gleichsinnig eine Druckzunahme, welche nicht durch die aus dem Bicarbonat des verflüssigten Kulturmediums entwickelte Kohlensäure bedingt wird. Diese Fehlerquellen werden durch die oben beschriebene Anordnung vermieden.

Verwendung von 10 bis 20 cmm Flüssigkeit überschritt der Messungsfehler nicht 7 Proz. (Protokoll 1). Da ein Stück Sarkomgewebe von 0,01 bis 0,02 mg Trockengewicht etwa 2 bis 2,5 mg des Kulturmediums verflüssigt, so genügen vier bis fünf Kulturen, um brauchbare Messungen zu erhalten. Ist der Kohlensäuredruck im Kulturgefäß bekannt (wie z. B. bei den unten beschriebenen Durchströmungsversuchen), so kann aus der Kohlensäurekonzentration und dem Bicarbonatgehalt des verflüssigten Mediums das p_H in der Umgebung der Explantate nach der *Henderson-Hasselbalch*schen Formel berechnet werden.

2. Milchsäurebestimmung.

Zur Bestimmung der durch den Stoffwechsel der Explantate gebildeten Milchsäure wurden 15 bis 20 Sarkomstücke in einer mit etwa 1 ccm Nährmedium beschickten großen Carrelschale implantiert und bei 38° im Brutschrank gehalten. Nach 18 bis 24 Stunden wurden die Sarkomexplantate aus dem verflüssigten Kulturmedium herausgehoben, in destilliertem Wasser gespült, getrocknet und gewogen (wobei das Gewicht der frei schwimmenden Zellen unberücksichtigt blieb). Das Koagulum wurde von der Schale abgelöst, mit Wasser versetzt, etwas erwärmt, ausgespült und die Milchsäure nach *Clausen*[1]) bestimmt. Die Differenz mit dem Milchsäuregehalt der Kontrolle (dasselbe Kulturmedium mit abgetötetem Gewebe oder ohne solches, während der gleichen Zeit im Brutschrank gehalten) ergab die Milchsäurebildung der Gewebsstücke.

3. Glucosebestimmung.

Die Glucose wurde nach *Jensen-Hagedorn*[2]) bestimmt.

Um die *Konzentration* der Glucose in der Umgebung der Explantate zu messen, wurde die Flüssigkeit wie bei der Bicarbonatbestimmung aus der Verflüssigungszone entnommen, doch war eine größere Menge, also auch eine größere Anzahl von Kulturen, zu einer Bestimmung erforderlich.

Der *Verbrauch* der Glucose durch die Gewebsstücke konnte, wie bei der Milchsäurebestimmung, durch Messung des Glucosegehalts im gesamten Kulturmedium und Wägung der Explantate festgestellt werden[3]).

---

[1]) Journ. Biol. Chem. 52, 263, 1922.

[2]) Diese Zeitschr. 135, 46, 1923.

[3]) Zuckerbestimmungen in Deckglaskulturen sind von *A. Krontowski* und *J. Bronstein* ausgeführt worden. Arch. f. exper. Zellforschung 3, 32, 1926.

4. Manometrische Messung des Stoffwechsels von Sarkomexplantaten[1]).

Die manometrische Messung des Stoffwechsels der aus dem Kulturmedium herausgehobenen Explantate wird genau so wie an Gewebsschnitten[2]) vorgenommen. Ich benutzte die oben beschriebenen kleinen Manometergefäße, deren Volumen etwa 4,5 ccm und deren Gefäßkonstante K_{CO_2} etwa 0,4 beträgt, so daß genügend genaue Werte mit etwa 0,3 mg Gewebe erhalten werden können.

Die bei Sarkomkulturen gefundenen Werte für die Glykolyse und deren Beeinflussung durch die Atmung stimmen überein mit den Höchstwerten, die an Schnitten von frisch entnommenem Gewebe gewonnen wurden[3]) (Protokoll 4, I).

5. Der Stoffwechsel in Carrel-Kulturen.

Sarkomexplantate können, wegen der rasch eintretenden zirkulären Verflüssigung des Kulturmediums, ohne anhaftendes Koagulum herausgehoben und gewogen werden, während bei normalem Gewebe, z. B. Fibroblastenkulturen, das Explantat und die ausgewachsenen Zellen mehr oder weniger fest im Plasmagerinnsel haften, so daß eine quantitative Messung auf erhebliche Schwierigkeiten stößt. Günstiger liegen die Verhältnisse beim Epithel, das in einer zusammenhängenden Schicht an der Oberfläche wächst, doch habe ich mich hier hauptsächlich auf Messungen in Sarkomkulturen beschränkt.

Die Milchsäurebildung der Sarkomexplantate in gewöhnlichen Carrel-Kulturen, unter aeroben Bedingungen, betrug im Durchschnitt 3 Proz. ihres Trockengewichts pro Stunde. Schnitte von Roussarkom, die man in Serum bewegt, bilden pro Stunde etwa 8 Proz. ihres Gewichts an Milchsäure bei einem Glucosegehalt von 0,2 Proz. und einer Bicarbonatkonzentration des Serums von $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter[4]). Der Glucosegehalt meines Kulturmediums war ungefähr der gleiche (0,2 bis 0,25 Proz. im Plasma, 0,12 Proz. im Embryonalsaft), die Bicarbonatkonzentration niedriger, nämlich $1{,}8 \cdot 10^{-2}$ bis $1{,}3 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter. Der kleinere Bicarbonatgehalt

---

[1]) Manometrische Messungen der Atmung von Explantaten von Kaltblütergewebe haben *R. Erdmann* und *E. Schmerl* ausgeführt. Zeitschr. f. exper. Zellforschung **2**, 283, 1926.

[2]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 334, 1923; **152**, 309, 1924; Klin. Wochenschrift Nr. 12, 1925.

[3]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **160**, 307, 1925.

[4]) Ebendaselbst **160**, 307, 1925. Mißt man die Glykolyse der Sarkomkulturen im bewegten Serum (oder Ringer), so erhält man etwa die gleichen Werte wie bei den frischen Gewebeschnitten; vgl. Prot. 4, I.

des Kulturmediums bedingte eine kleinere Gärung[1]), doch reichte dieser Umstand allein nicht aus, um die Verminderung der Gärung von 8 auf 3 Proz. zu erklären.

Die kleinere Gärung der Explantate hängt vorwiegend mit Verarmungserscheinungen zusammen, die sich infolge der langsamen Hydrodiffusion in der näheren Umgebung der ruhenden Gewebsstücke herausbilden. Um ein Urteil über das Maß dieser Verarmung zu gewinnen, habe ich in der Kultur Bicarbonat- und Glucosebestimmungen vorgenommen. Nach 48stündigem Wachstum war die Glucosekonzentration im Verflüssigungshof von 0,2 auf 0,05 Proz., der Bicarbonatgehalt von etwa $1{,}8 \cdot 10^{-2}$ auf $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter gesunken (s. Protokoll 2), was einem p_H unter 7,0 entspricht[2]). Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Konzentration in der *nächsten* Umgebung der Explantate noch geringer ist als es die in der gesamten Flüssigkeit gemessenen Werte zeigen.

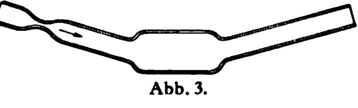
Aus Protokoll 3 ist der Einfluß der Bicarbonat- und Glucosekonzentration auf die Glykolyse zu sehen; bei einem Bicarbonatgehalt von $0{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter und einer Glucosekonzentration von 0,05 Proz. sinkt die Glucosespaltung um 35 Proz.

Es folgt daraus, daß die Explantate in der Kultur verhältnismäßig früh unter Bedingungen kommen, die den Stoffwechsel hemmen, und dieser Umstand erklärt, daß in Serum bewegte Tumorschnitte mehr Milchsäure bilden als die in der Kultur unbeweglich liegenden Gewebsstücke. Daher können die oben beschriebenen Bestimmungen wohl zur Beurteilung und zum Vergleich des Zustandes von Kulturen herangezogen werden, sie dürfen aber nicht als *Messungen* des Gewebestoffwechsels gelten.

III. Anaerobes Wachstum.

1. Versuchsanordnung.

Die Kulturgefäße hatten die Form kleiner Carrelschalen (Abb. 3). Auf dem Boden des Gefäßes wurde das Kulturmedium — Plasma und embryonaler Gewebssaft zu gleichen Teilen — in einer etwa 0,4 mm dicken Schicht ausgebreitet und das Gewebsstück (von etwa 0,01 bis 0,02 mg


Abb. 3.

Trockengewicht und 1 qmm Fläche) implantiert. Die Schale mündete in ein Gaszuleitungs- und Ableitungsrohr. Ich durchströmte die Gefäße mit Gasmischungen verschiedener Zusammensetzung, zog

---

[1]) Diese Zeitschr. 152, 313, 1924.

[2]) Auch die Umgebung der Fibroblastenkulturen und Herzexplantate wird saurer, allerdings in viel geringerem Maße als die der Sarkome (Protokoll 2).

das Ableitungsrohr zu einer Kapillare aus, setzte die Durchströmung fort, schmolz dann das Gefäß beiderseitig zu und hielt es 48 Stunden im Brutschrank. Um Zellbewegungen und Zellteilungen auch mit stärkeren Vergrößerungen beobachten zu können, verwandte ich einige Schalen, deren Boden aus einer angeschmolzenen, dünnen planparallelen Quarzplatte bestand.

Die Transplantation der frei in dem Verflüssigungshof schwimmenden Sarkomexplantate aus diesen Gefäßen ist leicht, dagegen macht das Ausschneiden der Explantate normaler Gewebe bei der Überpflanzung ziemliche Schwierigkeiten; es wurde daher noch eine andere Anordnung benutzt, die der von *Okamoto*[1]) beschriebenen gleicht.

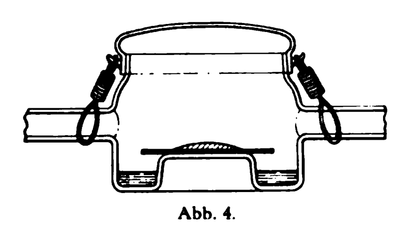


Abb. 4.

Eine offene Deckglaskultur wurde in eine Schale gelegt (die Abb. 4 veranschaulicht), die Schale zwischen zwei mit Ringerlösung gefüllte Kolben geschaltet und während der ganzen Versuchsdauer mit Gas durchströmt. So bequem diese Anordnung ist, macht das Vorhandensein von Schliffen (auch die Verbindung mit dem Kolben mußte durch Schliff oder Vakuumschlauch hergestellt werden) ihre Verwendung für streng anaerobe Versuche unbrauchbar.

2. Entfernung, Nachweis und Bestimmung von Sauerstoff.

Zur Herstellung anaerober Bedingungen benutzte ich ein Gasgemisch, das 5 Vol.-Proz. Kohlensäure und 95 Vol.-Proz. Stickstoff enthielt. Da in dem käuflichen Stickstoff 0,4 bis 0,7 Vol.-Proz. Sauerstoff vorhanden sind, wurde das Gas, um es von Sauerstoff zu befreien, durch ein etwa 1 m langes Quarzrohr, das mit Kupferspänen, die bis zur Rotglut erhitzt wurden, gefüllt war, geleitet; zwischen das Rohr und das Versuchsgefäß war eine Kühlschlange und ein Kolben mit Ringerlösung oder Wasser geschaltet.

Der Sauerstoffgehalt der Gasmischung wurde durch Schütteln mit Manganohydroxyd bestimmt. Das Verfahren ist ursprünglich von *Winkler*[2]) zur Bestimmung von in Wasser gelöstem Sauerstoff angegeben worden und beruht im Prinzip darauf, daß Manganohydroxyd durch den in Wasser gelösten Sauerstoff zu manganiger Säure oxydiert wird. Der aufgenommene Sauerstoff wird bestimmt, indem man die manganige Säure mit Salzsäure und Kaliumjodid versetzt und das

---

[1]) *J. Okamoto*, diese Zeitschr. **162**, 52, 1925.

[2]) *Treadwell*, Kurzes Lehrb. d. analyt. Chem. 2. Bd., **668**, **1922**; B. Ber. **21**, 1888.

ausgeschiedene Jod titriert. Die Methode ist von *Terry Hand*[1]) zur Bestimmung von atmosphärischem Sauerstoff angewandt und von *O. Warburg* auf folgende Weise modifiziert worden.

Eine Glaskugel von 1000 ccm Inhalt mündet in ein Gaszuleitungs- und Ableitungsrohr, die durch je einen Hahn verschließbar sind, und ist mit drei eingeschliffenen Ansatzgefäßen von je 15 ccm Inhalt versehen (s. Abb. 5). In die Kugel werden etwa 40 ccm einer 0,13 proz. NaOH-Lösung gefüllt, in die Ansatzgefäße kommen 65 mg $MnCl_2$, 15 mg KJ und 0,8 g $KHSO_4$ in Substanz.

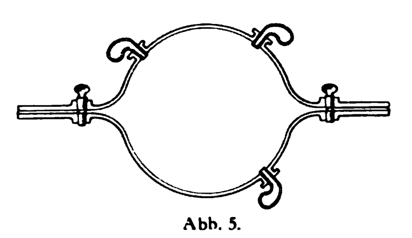


Abb. 5.

Das Gefäß wird evakuiert, mehrere Stunden mit dem Gasgemisch durchströmt und verschlossen. Durch Drehung der Ansatzbirnen und Neigung des Gefäßes wird das $MnCl_2$ und KJ in der Natronlauge gelöst und dann das Gefäß kräftig geschüttelt. Den sich bildenden Niederschlag läßt man absitzen und säuert dann durch Einkippen des primären Sulfats an. Das ausgeschiedene Jod wird, nach Zusatz von einigen Tropfen Stärkelösung, mit n/100 Natriumthiosulfat im Gefäß titriert. 0,003 ccm Sauerstoff in 1000 ccm Stickstoff ($3 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz.) sind noch titrierbar; kleinere Mengen können nach *Terry Hand* kolorimetrisch bestimmt werden, so daß noch 1,5 Teile Sauerstoff in 10^7 Teilen eines Gases nachzuweisen sind.

In der Leerkontrolle (Bestimmung des Sauerstoffs in dem evakuierten Gefäß) ist kein meßbarer Sauerstoff vorhanden.

Die Verwendung der Reagenzien in Substanz statt in Lösung gibt der Apparatur und deren Handhabung den Vorzug größerer Einfachheit und Sicherheit.

Der Gehalt meines Gasgemisches an Sauerstoff betrug etwa $2 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz. Sauerstoff. Da das Volumen eines zugeschmolzenen Gefäßes etwa 20 ccm war, so enthielt der Gasraum etwa $4 \cdot 10^{-2}$ cmm Sauerstoff. Zwei Gewebsstücke von 0,01 mg Trockengewicht würden bei normaler Atmung etwa $15 \cdot 10^{-2}$ cmm Sauerstoff in der Stunde verbrauchen [7 bis 8 cmm pro Milligramm und Stunde[2])]; der Sauerstoff im Gasraum des Kulturgefäßes könnte also die Atmung der Explantate nur für Minuten unterhalten. Ob man nun annahm, daß diese kleine Sauerstoffmenge bei normaler Atmung *schnell* oder bei verminderter Atmung *langsam* verbraucht wurde, sicher war, daß bei $2 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz.

[1]) *P. G. Terry Hand*, Journ. Chem. Soc. London **123**, 2573, 1922; Chem. Centralbl. **1924**, I, 365; *Rideal* und *Burgess*, Analyst **34**, 193.

[2]) Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

Sauerstoff nur ein ganz verschwindender Bruchteil des Energiebedarfs durch die Atmung gedeckt werden konnte.

In späteren Versuchen habe ich den Sauerstoffgehalt in den Kulturgefäßen noch weiter zu vermindern gesucht, soweit das mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln möglich war.

Um Stickstoff von Verunreinigungen durch Sauerstoff zu befreien, leitete *Strutt*[1]) Stickstoff durch ein mit Phosphor gefülltes Rohr und sah in dem Ausbleiben des Leuchtens am distalen Ende des Rohres eine Gewähr dafür, daß die Sauerstoffabsorption vollständig und das Gas sauerstofffrei war. Ein noch empfindlicherer Nachweis von Sauerstoffspuren ist nach *Strutt* und *Comte*[2]) der Nebel, den der Phosphor in Gegenwart von Sauerstoff bildet; nach einer Zusammenstellung von *Heyne*[3]) ist es die empfindlichste Reaktion auf Sauerstoff und zeigt noch einen Sauerstoffgehalt von $1 . 10^{-5}$ Proz. an.

Um also den noch im Gasraum und Kulturmedium vorhandenen Sauerstoff zu absorbieren und gleichzeitig einen direkten Nachweis für das Vorhandensein von Sauerstoffspuren zu haben, verfuhr ich folgendermaßen. Ich durchströmte die Kulturgefäße mit der Gasmischung wie vorher, brachte aber vor dem Abschmelzen der Röhren eine Stange frisch geschmolzenen, weißen Phosphors in die Gefäße (so daß der Phosphor das Kulturmedium nicht berührte) und schmolz dann zu. Bald nach dem Zuschmelzen war das Leuchten des Phosphors verschwunden und der leichte Nebel, der sich anfangs gebildet hatte, legte sich; ein Beweis dafür, daß der Sauerstoffgehalt unter 10^{-5} Proz. gesunken war. Wurden die Gefäße geöffnet, so leuchtete der Phosphor wieder auf und es trat starke Nebelbildung ein.

3. Anaerobes Wachstum der Sarkomexplantate.

Die Kulturversuche zeigten, daß das Roussarkom in $2 . 10^{-4}$ Vol.-Proz. Sauerstoff 48 Stunden lang wachsen kann: d. h. das feste Kulturmedium wurde von dem Gewebsstück tief verflüssigt, mit scharfem wie ausgestanztem Rande, Zellen emigrierten, wuchsen aus dem Stück heraus und teilten sich. Wurden die Gewebsstücke nach Ablauf von 48 Stunden in Luft auf Deckgläser überpflanzt, so konnten sie weiter gezüchtet werden, Stücke zugesetzten Muskels oder embryonalen Herzens wurden infiltriert. Nach 48stündiger Anaerobiose erneut in anaerobe Bedingungen gebracht, zeigten die Gewebsstücke weiterhin Wachstum, wenn auch langsameres als unter aeroben Verhältnissen. Bei der folgenden Transplantation gingen sie ein.

---

[1]) *R. J. Strutt*, Proc. Royal. Soc. A. 85, 219, 1911.

[2]) *Derselbe*, Physik. Zeitschr. 14, 215, 1913; *Comte*, ebendaselbst 14, 75, 1913.

[3]) *G. Heyne*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1925, Nr. 11, S. 1099.

Protokoll 4 zeigt, daß neben dem Wachstum auch der Stoffwechsel der Explantate im Laufe der Zeit abnahm.

Okamoto, der das Verhalten von Tumorschnitten im Serum unter anaeroben Bedingungen untersucht hat, fand nach mehrtägiger Versuchsdauer eine nur geringe Abnahme des Stoffwechsels; so konnte er z. B. beim Jensensarkom nach einem 120stündigen Verweilen in Stickstoff noch 75 Proz. der normalen Glykolyse messen. Der stärkere Abfall des Stoffwechsels in meinen Versuchen kann wohl durch die schlechten Diffusionsbedingungen im festen Kulturmedium (auf die ich oben näher eingegangen bin) erklärt werden.

In den Versuchen, wo strengste anaerobe Bedingungen durch Anwendung von Phosphor hergestellt wurden, hätte das Ausbleiben des Wachstums nichts bewiesen, da an eine Giftwirkung der Phosphordämpfe zu denken war. Doch trat eine solche Wirkung nicht ein, vielmehr wuchs das Sarkom bei Gegenwart von Phosphor nicht wesentlich schlechter als in $2 \cdot 10^{-4}$ Proz. Sauerstoff und konnte nach 48stündiger Wirkung des Phosphors in Deckglaskulturen weiter gezüchtet werden.

In den Durchströmungsversuchen (in kleinen Carrelschalen oder in den oben beschriebenen Gefäßen) wuchs das Sarkom bis zu 4 bis 5 Tagen (eine bis zwei Transplantationen).

Die geschilderten Versuche beweisen, daß das Roussarkom temporär anaerob wachsen kann.

4. Anaerobes Wachstum normaler Gewebe.

Die Abhängigkeit des Wachstums vom Sauerstoffdruck ist von *Burrows*[1]) an Explantaten von frisch entnommenen embryonalen Herzen und Haut untersucht worden. Er fand, daß die Fähigkeit des anaeroben Wachstums mit dem Alter abnähme: während Herzstücke vier- bis fünftägiger Hühnerembryonen in „reinem Stickstoff" wuchsen und sogar mehrere Stunden pulsierten, blieb das Wachstum von Herzen zehntätiger Embryonen vollständig aus.

Diese Beziehungen zwischen dem Alter der Gewebe und deren anaerobem Wachstum konnte ich bestätigen; allerdings trat auch bei Herzen 4 bis 5 Tage alter Embryonen unter meinen streng anaeroben Bedingungen (mit Phosphor) kein oder nur äußerst geringes Wachstum ein (vereinzelte kurze Sprossen); bei $2 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz. Sauerstoff aber war der Unterschied zwischen dem Wachstum jüngerer und älterer Herzen unverkennbar; so war z. B. bei fünftägigen Herzen das Auswachsen von Fibroblasten deutlich zu beobachten, während bei zehntägigen das Wachstum völlig unterblieb. Daß die Explantate durch

[1]) *Burrows*, Amer. Journ. Physiol. **48**, 13, 1913; **68**, 1924.; Proc. Soc. Exp. Med. **23**, 133, 1921.

das Durchströmen und Zuschmelzen (Druck, Temperatur, Verdunstung) nicht wesentlich geschädigt sein konnten, bewiesen die in Sauerstoff angestellten Kontrollen. Frisch explantierte Herzstücke pulsierten meist mehrere Tage, das Wachstum von Fibroblastenkulturen war so gut wie in den Deckglaskulturen, zuweilen schien es auch etwas rascher.

Von den Herzen fünf- und zehntätiger Embryonen wurden Fibroblastenkulturen angelegt, mehrere Wochen überpflanzt und dann unter anaerobe Bedingungen gebracht. Zwischen den Abkömmlingen jüngerer und älterer Herzen war nun kein Unterschied mehr wahrzunehmen. Sie wuchsen besser als das fünftägige Herz und trieben auch meist unter streng anaeroben Bedingungen vereinzelte, zuweilen recht lange Sprossen; eine dichte Wachstumszone trat aber nie auf. und ihr Wachstum ließ sich nicht mit demjenigen der Sarkome vergleichen.

Von Geweben erwachsener Tiere seien hier Milz und Blutzellen genannt. Die Milz zeigte unter anaeroben Bedingungen geringe Zellemigration und ab und zu vereinzelte fibroblastenähnliche Sprossungen. Monocyten habe ich nur in Durchströmungsversuchen untersucht. Sie waren gegen Sauerstoffmangel nicht empfindlicher als Fibroblasten und gaben zuweilen das bekannte Bild der Umwandlung in fibroblastenähnliches Gewebe.

IV. Wachstum in glucosearmem Medium.

Wenn es die Glucose ist, auf deren Kosten das Sarkom bei Abwesenheit von Sauerstoff wachsen kann, so wird das anaerobe Wachstum in glucosefreiem Kulturmedium ausbleiben. Zur Prüfung dieser Frage habe ich den Zucker aus dem Plasma und dem embryonalen Gewebssaft durch Dialyse weitgehend entfernt und den Einfluß der Dialyse auf das Wachstum untersucht.

Plasma und Embryonalsaft wurden in sterile, nach den Angaben von *Lundsgaard*[1]) hergestellte Kollodiumhülsen von 0,5 bis 1,0 ccm Inhalt mit Einschließung einer Luftblase gefüllt und unter langsamem Wiegen[2]) der Hülse und Rühren der Außenflüssigkeit in Eis bei 0 bis 2° gegen Ringerlösung 8 bis 24 Stunden dialysiert. Die Ringerlösung – etwa 2 Liter –, mit dem Bicarbonatgehalt des Serums und einem Zusatz von primärem Natriumphosphat (etwa 0,005 Proz.), wurde alle 2 Stunden erneuert.

---

[1]) *C. Lundsgaard* und *A. Holbøll*, Journ. Biol. Chem. **68**, 439, 1926.
[2]) Rasches Schütteln setzt nach *Carrel* die wachstumsfördernde Wirkung des embryonalen Gewebssaftes stark herab.

Nach achtstündiger Dialyse betrug der Glucosegehalt des aus den dialysierten Komponenten hergestellten Mediums etwa 0,007 Proz. (gemessen nach *Jensen-Hagedorn*). Wurden Gewebsstücke, annähernd von der Größe der gewöhnlichen Explantate, in dieses dialysierte Medium gebracht[1]) und ihr Stoffwechsel nach *O. Warburg* manometrisch gemessen, so ergaben sich geringe, kaum meßbare Glykolysewerte (Protokoll 5). Setzte man dem dialysierten Medium Glucose bis zu einer Konzentration von 0,2 Proz. zu, so war der Stoffwechsel darin wieder normal, ein Beweis dafür, daß eine den Stoffwechsel der Gewebe beeinträchtigende Schädigung des Mediums durch die Dialyse nicht aufgetreten war (Protokoll 5).

Der Glucosegehalt des 24 Stunden lang dialysierten Mediums betrug etwa 0,005 Proz.

In diesem glucosearmen Medium wurden Stücke von Roussarkom implantiert. Als Kontrolle diente neben dem genuinen Medium das dialysierte, dessen Zuckergehalt durch Zusatz von Glucose auf 0,2 Proz. (die Zuckerkonzentration des Hühnerserums) gebracht worden war.

Der Sauerstoffgehalt im Gasraum variierte zwischen 95 Vol.-Proz. und $2 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz., die Kohlensäurekonzentration betrug in den zugeschmolzenen oder durchströmten Gefäßen 5 Vol.-Proz.

Die Ergebnisse waren je nach dem Sauerstoffgehalt und der Dauer der Dialyse verschieden.

Nach achtstündiger Dialyse:

In 95 Proz. Sauerstoff: bei 0,007 Proz. Glucose gehemmtes aber deutliches Wachstum; 0,2 Proz. Glucose, Wachstum wie im genuinen Medium.

In 0,4 Proz. Sauerstoff: bei 0,007 Proz. Glucose vollständige Wachstumshemmung; bei 0,2 Proz. Glucose Wachstum fast wie im genuinen Medium (zirkumskripte Verflüssigung, Emigration und am Rande herauswachsende Zellen).

In $2 \cdot 10^{-4}$ Sauerstoff: bei 0,007 Proz. Glucose vollständige Wachstumshemmung; bei 0,2 Proz. Glucose spärliche Zellemigration, kein Wachstum.

Nach 24stündiger Dialyse fand im allgemeinen im dialysierten Medium ohne Zuckerzusatz auch in Sauerstoff kein Wachstum statt.

Den Einfluß der Glucosekonzentration veranschaulicht folgender Versuch, der mit einer größeren Reihe von Deckglaspräparaten angestellt wurde.

---

[1]) Es wurde hier, wegen der beim Schütteln des Plasmas eintretenden Gerinnung, statt des Plasmas Serum genommen.

Nach 24stündiger Dialyse:

Zusammensetzung des Mediums	Alter der Explantate	Gesamtzahl der Explantate	Wachstum der Explantate nach 48 Stunden		
			Circumskripte Verflüssigung. Emigration, am Rande auswachsende Zellen	Fibroblastenähnliches Wachstum	Kein oder sehr spärliches Wachstum
			Zahl der Explantate		
Genuines Med. Glucosegehalt etwa 0,2 Proz.	Etwa 1 Woche (2.–3. Passage)	41	37	2	2
Dialysiertes Med. mit Zuckerzusatz. Glucosegehalt 0,2 Proz. 7 Teile Med. + 1 Teil Glucoselösung	Ebenso	6	6	0	0
Dialysiertes Med. mit Aq. dest. Glucosegehalt 0,005 Proz. 7 Teile Med. + 1 Teil Aq. dest.	„	6	1	0	5
Dialysiertes Med. mit Ringerlösung. Glucosegehalt 0,005 Proz. 7 Teile Med. + 1 Teil Ringerlösung	„	7	0	0	7
Dialysiertes Med.	„	5	0	0	5
„ „	ca. 6 Monate (ca. 87. Passage)	6	0	0	6

Fibroblastenkulturen verhielten sich den Sarkomkulturen insofern ähnlich, als auch hier das Wachstum im glucosearmen Medium geringer war und in einem Medium mit einem Glucosegehalt von 0,005 Proz. ganz oder nahezu ganz ausblieb. Doch war, im Vergleich mit Sarkom, der Einfluß des Glucosezusatzes auf das Wachstum geringer und unregelmäßiger.

Aus den Versuchen folgt, daß in 95 Proz. Sauerstoff Wachstum noch bei niederer Glucosekonzentration (0,007 Proz.) möglich ist, aber bei weiterer Herabsetzung des Glucosegehalts schließlich ganz aufhört. Bei 0,4 Proz. Sauerstoff genügen dagegen auch 0,007 Proz. Glucose nicht mehr, um das Wachstum aufrechtzuerhalten. Sowohl in 95 Proz. als auch in 0,4 Proz. Sauerstoff kann der Zusatz von Zucker für kurze Zeit die Wachstumsbedingungen des Sarkoms im genuinen Medium

erzeugen. Man erkennt daraus die Bedeutung der Glucose für das Wachstum, die — zum mindesten für kurze Zeiten — wichtiger für das Wachstum ist als alle übrigen dialysierbaren Substanzen.

Dies gilt nicht für sehr niedrige Sauerstoffdrucke. In $2 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz. Sauerstoff erzeugt Zusatz von 0,2 Proz. Glucose nicht die Wachstumsbedingungen des genuinen Kulturmediums, vielmehr scheint es, daß für streng anaerobes Wachstum noch eine andere dialysierbare Substanz notwendig ist.

V. Hefe.

Anaerobes Wachstum und seine Beziehung zur Zuckerspaltung ist am frühesten und eingehendsten an Hefezellen untersucht worden, deren Verhalten mit demjenigen der Tumoren große Ähnlichkeit zeigt. Es schien daher von Interesse, das anaerobe Wachstum der Hefe mit der Anaerobiose des Roussarkoms unter denselben Bedingungen zu vergleichen.

Das *Carrel*sche Kulturmedium wurde durch Bierwürzeagar ersetzt, das Roussarkom durch Reinkulturen von Hefen (eine Portweinhefe, ein Saccharomyces cerevisiae und eine untergärige Bierhefe[1]); im übrigen geschah alles wie bei den Gewebsversuchen. Das Wachstum der Hefe[2]) in 0,4 Vol.-Proz. Sauerstoff war ebensogut wie in Luft oder 100 Vol.-Proz. Sauerstoff. Dagegen zeigte sich beim Übergang zu $2 \cdot 10^{-4}$ Vol.-Proz. Sauerstoff eine sehr erhebliche Wachstumshemmung.

Das Roussarkom ist also, wenn wir das Wachstum in kurzen Zeiten ins Auge fassen, zum mindesten nicht empfindlicher gegen Sauerstoffmangel als die Hefe.

VI. Protokolle.

Protokoll 1.

Bicarbonatbestimmung in großen und kleinen Flüssigkeitsmengen.

Gefäßvolumen	$v = 20{,}34$	$v = 4{,}72$	$v = 4{,}5$
Im Hauptraum	0,5 ccm Serum	0,3 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung 0,2 ccm n/100 Weinsäurelösung	
Im Ansatz	0,2 ccm 4 proz. Citronensäure	12,8 mg Serum	10,8 mg Serum
Gefäßkonstante	$K_{CO_2} = 1{,}9$	$K_{CO_2} = 0{,}44$	$K_{CO_2} = 0{,}41$
Druckänderung n. Entwicklung der Kohlensäure	+ 94,5 mm	+ 9,5 mm	+ 8,5 mm
cmm Bicarb. pro 1 ccm Serum	347 cmm	325 cmm	324 cmm

[1]) Bierwürzeagar und die Hefekulturen verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Dr. *Haehn*, Institut f. Gärungsgewerbe, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen Dank sage.

[2]) Bei einer Temperatur von 18 bis 30° C.

Protokoll 2.

Bicarbonatbestimmung im verflüssigten Kulturmedium.

Gewebe: / nach:	Embr. Herz 1. Passage / 48 Stdn.	Fibroblastenkulturen / 48 Stdn.	Roussarkomkulturen / 48 Stdn.	Roussarkomkulturen / 60 Stdn.
Temperatur . . .	15,7°	22,5°	22,5°	18,3°
Gefäßvolumen . .	$v = 4{,}72$	$v = 4{,}72$	$v = 4{,}5$	$v = 4{,}5$
Im Hauptraum:				
0,9 proz. Na Cl-Lsg.	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm
n/100 Weinsäurelsg.	0,2 „	0,2 „	0,2 „	0,2 „
Flüssigk. i. Ansatz	22,9 mg	29,4 mg	13,3 mg	14 mg
Gefäßkonstante .	$K_{CO_2} = 0{,}44$	$K_{CO_2} = 0{,}43$	$K_{CO_2} = 0{,}4$	$K_{CO_2} = 0{,}4$
Druckänderg. nach Entwicklung der Kohlensäure . .	+ 11,5 mm	+ 19 mm	+ 5 mm	+ 3,5
cmm Bicarb. pro 1 ccm Flüssigkeit	220 cmm	280 cmm	150 cmm	100 cmm

Protokoll 3.

Einfluß der Bicarbonat- und Zuckerkonzentration auf die Glykolyse. Frisch entnommenes Roussarkom wurde in Stücke von der Größe gewöhnlicher Explantate zerschnitten.

Temperatur		37,5°	37,5°
Volumina		$v_F = 0{,}5$ (Ringerlsg.) $v_G = 4{,}22$	$v_F = 0{,}5$ (Ringerlsg.) $v_G = 4{,}00$
Gefäßkonstante		$K_{CO_2} = 0{,}4$	$K_{CO_2} = 0{,}38$
Bicarbonatkonzentration		$0{,}5 \cdot 10^{-2}$ mol.	$2{,}5 \cdot 10^{-2}$ mol.
Glucosekonzentration		0,0055 Proz.	0,2 Proz.
Gewicht der Gewebsstücke		0,47 mg	0,63 mg
Gasraum 5 Proz. CO_2 in O_2	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 10,5 mm	+ 22,5 mm
Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 22,5 mm	+ 37 mm
	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 18 mm	+ 36 mm
$Q_{CO_2}^{N_2}$		+ 30	+ 46

Protokoll 4.

Stoffwechsel des Roussarkoms nach 48stündigem aeroben und anaeroben Wachstum.

In 1: Die Explantate befanden sich 48 Stunden in O_2.
In 2: Die Explantate befanden sich 48 Stunden in N_2.

Der Stoffwechsel wurde in Ringerlösung gemessen. Bicarbonatkonzentration 2,5 . 10^{-2} mol. Glucosekonzentration 0,2 Proz.

		1.	2.
Temperatur		37,5°	37,5°
Volumina		$v_G = 4{,}22$, $v_F = 0{,}5$	$v_G = 4{,}0$, $v_F = 0{,}5$
Gefäßkonstante		$K_{CO_2} = 0{,}4$	$K_{CO_2} = 0{,}38$
Gewicht der Explantate		0,2 mg	0,3 mg
Zahl der Explantate		17	32
Gasraum 5 Proz. CO_2 in O_2	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 4,0	+ 2,0
Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 11,5	+ 7,0
$Q_{CO_2}^{N_2}$		+ 46	+ 18

Protokoll 5.

Glykolyse des Roussarkoms im dialysierten Medium (Serum und embryonaler Gewebssaft zu gleichen Teilen.)

Nach siebenstündiger Dialyse betrug die Zuckerkonzentration 0,007 Proz. (Bestimmung nach *Jensen-Hagedorn*).

Frisch entnommenes Roussarkom wurde in Stücke von der Größe der Explantate zerschnitten (etwa 0,02 mg Trockengewicht).

In 1: Dialysiertes Medium.
In 2: Dialysiertes Medium mit Zuckerzusatz.

		1.	2.
Temperatur		37,5°	37,5°
Volumina		$v_G = 4{,}2$, $v_F = 0{,}5$	$v_G = 4{,}0$, $v_F = 0{,}5$
Gefäßkonstante		$K_{CO_2} = 0{,}4$	$K_{CO_2} = 0{,}38$
Glucosekonzentration		0,007 Proz.	0,2 Proz. (Zusatz von 0,025 ccm 5,6proz. Glucose)
Gewicht der Gewebsstücke		0,84 mg	0,82 mg
Zahl der Gewebsstücke		41	40
Gasraum 5 Proz. CO_2 in O_2	Beobachtete Druckänderung in 15 Min.	± 0	+ 14,5 mm
Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 4,5 mm	+ 47,0 mm
	Beobachtete Druckänderung in 30 Min.	+ 3,5 mm	+ 47,5 mm
$Q_{CO_2}^{N_2}$		+ 4	+ 44

Über Potentialdifferenzen am Apfel.

Von

Ludwig Jost.

(Aus dem botanischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1926.)

In der Serie von Untersuchungen über elektrische Erscheinungen an Membranen, mit der *Michaelis*[1]) und seine Mitarbeiter die Physiologie beschenkt haben, behandelt die erste[2]) die Potentialdifferenz an der Apfelschale. *Fujita* legt, ähnlich wie es früher *Beutner* schon tat, einen Apfel in eine Petrischale, die in flacher Schicht eine Elektrolytlösung enthält, bohrt oben ein kleines Loch in das Fruchtfleisch und füllt dieses Loch mit n/10 KCl-Lösung. Er leitet dann aus der Petrischale einerseits, aus dem Loche des Apfels andererseits in bekannter Weise ab und mißt die Potentialdifferenz mit dem Kapillarelektrometer. „*Wir messen somit*" — sagt er — „*den Potentialunterschied des Apfelsaftes gegen die äußere Elektrolytlösung in der Petrischale.*" *Fujita* hat nun elektromotorische Kräfte von recht beträchtlicher Höhe bekommen, insbesondere, wenn er die Elektrolytlösung in der Petrischale sehr verdünnte, also den „Verletzungsstrom" noch durch Konzentrationseffekte vergrößerte; so z. B. 148 Millivolt bei n/1250 NaCl, 161 Millivolt bei n/1250 LiCl. Er kommt zu der Vorstellung, daß „*die homogene lipoidartige, zellfreie Außenschicht des Apfels die Bedingungen für die Entstehung der Potentialdifferenzen gibt*" (S. 26). Die Richtigkeit dieser Vorstellung müssen wir in Zweifel ziehen.

Die Bestätigung der *experimentellen* Ergebnisse *Fujitas* macht keine Schwierigkeiten. Ich arbeitete vielfach mit einem kleinen sauren Apfel von Pirus coronaria, der sich durch recht derbe Kutikula auszeichnet. Gewöhnlich wurden Pinselelektroden zur Ableitung verwendet. Wie auch *Fujita* fand, ergeben die einzelnen Äpfel recht verschiedene elektromotorische

---

[1]) *Michaelis, Fujita* und *Dokan*, diese Zeitschr. **158**, **159**, **161**, **162**, **167**, 1925/26; Naturwissenschaften **14**, 33.

[2]) *Fujita*, diese Zeitschr. **158**, 11, 1925.

Kräfte. In einem Einzelfall wurden folgende Werte in *Millivolt* erhalten; positiv wird der äußere Elektrolyt; in der Höhlung befindet sich immer n/10 KCl.

	Außenlösung					Differenz zwischen n/10 und n/1250 NaCl
	n/10 KCl	n/10 NaCl	n/50 NaCl	n/250 NaCl	n/1250 NaCl	
Apfel I	28	36	66	94	114	78
„ I (später)	—	64	68	100	138	74
„ II	—	78	76	124	152	74

An einem anderen Apfel, der bisher in n/6250 NaCl liegend 100 Millivolt ergeben hatte, wurde unten eine ganz kleine Flächenwunde angebracht, die wenige Quadratmillimeter, im wesentlichen nur Epidermiszellen, entfernte, also die Kutikula durchlöcherte. Sofort sank die elektromotorische Kraft auf 64, um im *Laufe einer Viertelstunde* wieder etwa den ursprünglichen Wert zu erreichen (108 Millivolt). Wir haben hier den negativierenden Effekt einer Verwundung vor uns, der bei so kleinen Verletzungen, z. B. auch Einstichen mit Glasnadeln, immer rasch vorüber geht[1]).

In einem zweiten solchen Versuch (Apfel unten in n/1250 NaCl) war der ursprüngliche Wert 122 Millivolt; er fiel nach Anbringung der Wunde auf 86 und erreichte nach einer Viertelstunde wieder 116. Nach Anbringung einer zweiten ähnlichen Wunde 68; nach einer halben Stunde 112. Nun wurde eine neue, sehr viel größere Wunde angebracht und bewirkte ein Sinken der elektromotorischen Kraft auf 40; auch nach 1 Stunde ist nicht der ursprüngliche Wert, sondern nur 98 Millivolt erreicht.

Diese Versuche zeigen, daß nach Anbringung eines groben Loches in der Kutikula die elektromotorische Kraft rasch den ursprünglichen Wert wieder annehmen kann. Auch mit durchlöcherter Kutikula kann man Spannungen von 120 Millivolt bekommen, und somit ist klar, daß zum mindesten nicht die *Kutikula* allein, sondern auch das über ihr liegende Apfelgewebe die Bedingungen der beobachteten Potentialdifferenzen schafft.

Bringt man an einem Apfel oben und unten in gleicher Weise mit dem Korkbohrer flache Höhlungen an und füllt beide mit n/10 KCl, so kann man je nach Umständen die eine oder die andere Wunde negativ gegen die andere finden; es kann auch zufällig die Potentialdifferenz 0 herrschen. In einem Einzelfalle z. B. war eine Potentialdifferenz von — 4 Millivolt gegeben. Wurde jetzt die untere Höhlung in n/250 NaCl gelegt, so kamen + 34 Millivolt, in n/1250 NaCl + 62 Millivolt zur Beobachtung, also Differenzen von 38 und 66 Millivolt gegen den ursprünglichen Zustand.

Es läßt sich also auch dann, wenn mehr als die Kutikula, wenn die ganze *Schale* (d. h. Epidermis und Kollenchym) des Apfels zwei-

[1]) Da durch solche kleine Verletzungen die Messungen sehr erleichtert werden, da der Widerstand erheblich abnimmt, brachte ich sie meistens vor Beginn der Versuche *oben* am Apfel an und wartete dann, bis der Wundeffekt ausgeklungen war.

seitig völlig entfernt ist, ein Konzentrationseffekt erzielen, der dem am intakten Apfel völlig entspricht. *Der von Fujita beobachtete Effekt ist also von der Kutikula recht unabhängig.*

Macht man den umgekehrten Versuch, vertieft man die *einseitige* obere Wunde so weit, daß sie fast bis zur unteren Schale reicht, so daß etwa ½ cm Fruchtfleisch noch erhalten bleibt, so wurde mit n/10 KCl gegen n/1250 NaCl nur 24 Millivolt erzielt, und nachdem die Reste des Fruchtfleisches entfernt waren, sank gar die Kraft auf 4 bis 8 Millivolt. Wird ein solcher ausgehöhlter Apfel, der unten im wesentlichen nur durch die Kutikula abgeschlossen ist, bei dem aber alle etwa noch innen ihr ansitzende Zellen *getötet* sind, nun mit dem Saft gefüllt, den man aus frischen Äpfeln mit einer hydraulischen Presse ausgepreßt hat, so konnten immerhin 24 Millivolt festgestellt werden. Einen ähnlichen Wert (30 Millivolt) erhielt ich an einem größeren Stück durch Kochen isolierter Apfelschale, das ebenfalls einerseits an Preßsaft, andererseits an n/1250 NaCl angrenzte.

Wenn also das lebende Fruchtfleisch möglichst entfernt ist und statt seiner Preßsaft an die äußerste Apfelschale angrenzt, ist der Konzentrationseffekt zwar erheblich geringer, aber doch durchaus nicht verschwunden. Somit könnte man leicht zu der Schlußfolgerung kommen, daß das *lebende* Parenchym des Apfels viel wichtiger für die Entstehung von Potentialdifferenzen sei als die Kutikula.

Nun hat aber *Fujita* ganz besonderen Nachdruck darauf gelegt, daß auch nach Einwirkung von *Zellgiften* die Potentialdifferenzen *unverändert* bleiben. Er hat Äpfel 12 Stunden lang in Formollösung verschiedener Konzentration getaucht und findet den Konzentrationseffekt mit Salzen so groß wie am lebenden Apfel. Er hat ferner Äpfel mit Sublimat, mit Äther, n/10 KOH, n/10 HCl, 70proz. Alkohol behandelt, endlich auch gekocht. An vier frischen Äpfeln war die Potentialdifferenz zwischen n/10 und n/1250 KCl zu 97, 88, 107, 100 Millivolt gefunden worden. Nach Behandlung mit 1proz. Formol wurden 100, mit 10proz. Formol 91, mit Sublimat (1prom.) 92, mit KOH (n/10) 101, mit HCl (n/10) 92, mit Alkohol (70proz.) 80 und nach Kochen 63 Millivolt gefunden. Man darf also höchstens dem Alkohol und der Kochhitze eine Erniedrigung der Potentialdifferenz zuschreiben, und man versteht, daß *Fujita* sagen kann: „*Die Wirkungslosigkeit dieser starken Eingriffe zeigt, daß die wirksame Membran keine protoplasmaähnliche Struktur haben kann*“ (S. 26). Leider fehlen die Einzelheiten, wie die Versuche angestellt worden sind, und vor allem Untersuchungen, ob die Gifte eingedrungen sind und die Zellen im Innern wirklich getötet haben. Daß diese Frage nicht müßig ist, haben meine Versuche sehr deutlich gezeigt. Über Nacht mit NaOH (n/10), HCl (n/10), Sublimat (1prom.) und Formol (10proz.) behandelte Äpfel von Pirus coronaria zeigten am nächsten Morgen, vor allem

in den hypodermalen Zellen, mit 16 Proz. Kalknitrat sehr schöne Plasmolyse; auch in den Epidermiszellen wurde Plasmolyse beobachtet; doch kann ich nicht ganz sicher behaupten, daß hier noch *alle* Zellen lebten. Scheiden also *diese* Zellgifte offenbar wegen zu geringer Permeabilität der Kutikula aus, so bleiben doch der Äther und Wasserdampf als Mittel, die rasch alle Gewebe auch in der Tiefe abtöten. Es lag mir nun daran, die Potentialdifferenzen an ein und demselben Apfel vor und nach der Abtötung festzustellen.

Konzentrationseffekt (n/1250 NaCl gegen n/10 NaCl)
(1—4 mit Äther getötet; 5—8 gedämpft) [1]).

	Apfel Nr.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Frisch	28	27	16	54	36	26	29	74
Getötet	12	15	16	40	21	26	25	34
Differenz:	16	12	0	14	15	0	4	40

Woher es kommt, daß manchmal der Konzentrationsunterschied durch Abtöten gar nicht geändert wird, manchmal aber nicht unerheblich sinkt, vermag ich nicht zu sagen. Jedenfalls ergeben aber die Versuche in sehr deutlicher Weise, daß der Konzentrationseffekt durch Abtöten *nicht* verschwindet. Daß aber zwischen totem und lebendem Apfel trotzdem *elektrisch sehr große Unterschiede* bestehen, muß auf das schärfste hervorgehoben werden. Der *Verwundungseffekt*, der sich im Negativwerden einer Wunde oder Quetschstelle äußert, ist auf den *lebenden* Apfel beschränkt. Doch auch im Konzentrationseffekt verhalten sie sich nicht gleich.

Versuche an toten Äpfeln.

Konzentrationseffekt (n/1250 NaCl gegen n/10 NaCl) in Millivolt.

	Gekocht		Äther getötet	
	1	2	3	4
Unverletzt	40	34	32	34
Oben Kuppe weggeschnitten . .	40	36	30	36
Hälfte weggeschnitten	32	—	—	36
Auch unten Kuppe entfernt . .	—	22	25	20
Über Nacht in fließendem Wasser	—	4	—	0

[1]) Daß in 4 und 8 so viel größere Werte (entsprechend den S. 401 mitgeteilten) auftreten als in 1 bis 3 und 5 bis 8 hängt damit zusammen, daß 4 und 8 früher im Jahre an *unreiferen* Äpfeln ausgeführt wurden.

Versuche an lebenden Äpfeln.

Der Einfluß von Abtragungen oben und unten auf den Konzentrationseffekt ist schwer zu untersuchen, weil eben der Verwundungseffekt hier dazu kommt und längere Zeit braucht, bis er konstant wird. Ich beschränkte mich deshalb auf folgenden Versuch: An zwei Äpfeln wurden möglichst gleiche Kuppen oben und unten abgeschnitten, so daß sie also mit Wundflächen an die Ableitungsflüssigkeiten grenzten. Erst mehrere Stunden nach Anbringung der Wunde wurde der Konzentrationseffekt an solchen lebenden Apfelstücken ohne Schale bestimmt.

	Kozentrationseffekt in Millivolt	
	1	2
Intakter Apfel	18	32
Verwundeter Apfel	19	24
Derselbe über Nacht in Wasser	13	16

Die Versuche zeigen, daß ein frischer Apfel wie ein toter auch *ohne alle Schale* einen Konzentrationseffekt geben kann. Nach Wässern durch etwa 12 Stunden hat das lebende Apfelgewebe diese Eigenschaft behalten, das tote hat sie verloren.

Blicken wir auf die Versuche zurück, so ergibt sich folgende Gesamtauffassung. *Apfelzellsaft* kann gegen n/1250 Na Cl hohe elektromotorische Kräfte bilden, wenn er durch eine passende Membran von ihr getrennt wird. Als solche Membranen kommen in Betracht:

1. *die Kutikula.* Es ist gezeigt, daß mit der *toten Schale* (an der zweifellos die Kutikula maßgebend ist) und Preßsaft *allein* eine elektromotorische Kraft erzielt werden kann, die freilich kleiner ist als die am lebenden Apfel auftretende.

2. *die Zellmembran.* Auch tote Fruchtfleischstücke des Apfels, die der Kutikula beraubt sind, geben Potentialdifferenzen. Bei längerem Liegen in Wasser diffundiert der Zellsaft allmählich heraus und dann hört diese Erscheinung auf. Auch in den Kapillaren von Filtrierpapier gibt Apfelpreßsaft entsprechende Werte, die freilich hier sehr viel rascher fallen als im Apfelgewebe. So wurden z. B. mehrfache Lagen von Filtrierpapier mit Preßsaft getränkt und ergaben zwischen n/10 und n/1250 NaCl 38 Millivolt; schon nach 6 Minuten war der Wert auf 28 Millivolt gesunken.

3. *das Protoplasma.* Im *lebenden* Apfel ist der Zellsaft von Protoplasma umschlossen und dieses muß die Rolle der Membran spielen. So ist verständlich, daß am lebenden Apfel die Gegenwart der Schale für die Höhe der elektromotorischen Kraft gleichgültig ist, am toten auf die Dauer nicht.

Dem Konzentrationseffekt an der Apfelschale hat schon *Beutner*[1]) große Aufmerksamkeit geschenkt. Er hat nicht wie *Fujita* mit oberseits verletzten, sondern mit intakten Äpfeln gearbeitet, und dementsprechend fehlt bei ihm die durch Verletzung bedingte Potentialdifferenz, die sich bei *Fujita* in allen Versuchen zu den anderen Wirkungen hinzuaddiert. So berichtet *Beutner* (S. 135) über einen Versuch, in dem oben am Apfel mit m/10 KCl, unten abwechselnd mit m/1, m/10, m/100, m/1000 KCl abgeleitet wurde. Es wurden dabei die Werte 8 bzw. 22, 68 und 120 Millivolt erhalten. Wurde dann „auf der ganzen unteren Hälfte des Apfels die äußere Haut (Kutikula) abgeschält, ohne irgendetwas von dem Fruchtfleisch fortzuschneiden", so ergaben die gleichen Versuche 20, 11, 7, 27 Millivolt. Es beträgt demnach der Konzentrationseffekt:

	Unverletzt	Verletzt
Zwischen m/1000 und m/100 KCl	52	20
„ m/100 „ m/10 KCl	46	—4
„ m/10 „ m/1 KCl	14	—9

Beutner (S. 136) schließt: Der Konzentrationseffekt der verletzten Schale ist viel geringer als der der unverletzten. „Der größere Konzentrationseffekt wird also nur durch eine dünne, oberflächliche Schicht hervorgebracht, die reich an Säuren ist; nach Entfernung derselben stößt man auf Schichten, die keinen so großen Konzentrationseffekt zeigen, offenbar weil sie weniger Säuren enthalten. Dies stimmt auch mit mikrochemischen Untersuchungen überein."

Dazu ist zu bemerken, daß die Entfernung der Kutikula „ohne irgend etwas von dem Fruchtfleisch fortzuschneiden", technisch unmöglich ist. Der Bau der Apfelschale ist ja folgender: Die Epidermis ist eine lückenlos schließende Zellage, die mit Kutin überzogen und in ihrer Außenwand und den Seitenwänden mit Kutin durchtränkt ist. Die Innenwand ist wenigstens bei Pirus malus kutinfrei (bei coronaria enthält auch sie stellenweise Kutin). Der Epidermis schließen sich dann einige Lagen von Kollenchym an, zunächst auch noch *ohne alle* Interzellularen; diese treten dann erst weiter innen im Parenchym des Fruchtfleisches auf. Die durch Kochen isolierte Schale enthält neben der Epidermis immer noch wenigstens *eine* Kollenchymlage.

[1]) *R. Beutner*, Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben. Stuttgart 1920.

Die mitgeteilte Beobachtung ist nun für *Beutner* die Grundlage seiner *Theorie des Verletzungsstromes* geworden. Er vergleicht den Apfel mit der *Cremer*schen Nitrobenzolkette:

–	NaCl der Elektrode	/	Nitrobenzol mit Säure	ohne Säure	/	NaCl der Elektrode	+

So wie bei dieser die stromliefernde Asymmetrie in der *wasserunmischbaren Membran*, dem Nitrobenzol, liegt, so soll beim Apfel eine Differenz zwischen der „säurehaltigen“ Kutikula und der säurefreien inneren Membran bestehen, die zur Entstehung von Potentialdifferenzen führt:

–	NaCl der Elektrode	/	säurehaltige Kutikula	säurefreie Parenchymmembran	/	NaCl der Elektrode	+

Die wichtigsten Versuche, die *Beutner* zur Stützung dieser Theorie ausgeführt hat, sind folgende:

1. Die schon besprochenen Konzentrationseffekte und deren starkes Zurückgehen nach Entfernung der Kutikula.

2. Ein Apfel wird oben verletzt. Die Ableitung erfolgt an der Verletzungsstelle und in der Schale aus *gleichen* und gleich konzentrierten Elektrolyten. Es tritt ein Verletzungsstrom auf, dessen Größe annähernd die gleiche bleibt (40 Millivolt), ob eine kleine Kuppe oder ein immer größeres Stück des Apfels entfernt wird. „Erst nachdem man das ganze Fruchtfleisch bis auf eine $1/4$ cm dicke Schicht abgetragen hat, sinkt die Kraft in einem wahrnehmbaren Betrag. Ist schließlich alles Fruchtfleisch bis zur inneren Seite der entgegengesetzten Schale entfernt, so sinkt die Kraft nahezu auf Null“ (S. 137). *Beutner* deutet den Versuch so: Nur die äußere Schale in sehr dünner Schicht wirkt als säurereiches Öl, das ganze innere Gewebe ist säurearm. Wird letzteres so weit abgetragen, daß die Kutikula so gut wie allein übrigbleibt, so muß natürlich der Strom aufhören, weil jetzt die gleiche Ableitungsflüssigkeit von innen und außen direkt an die Kutikula anstößt und ein System $^1/_{10}$ KCl/Kutikula/$^1/_{10}$ KCl keinen Strom geben kann.

3. Wie *Verwundung* wirkt auch eine *Quetschung*, bei der die Kutikula völlig intakt erhalten bleibt. Nach *Beutner* (S. 142) hängt das *nicht* etwa damit zusammen, daß eine Quetschung eben genau wie ein Schnitt eine gewaltsame Schädigung des Gewebes darstellt, sondern damit, daß eine Trennung der inneren säurearmen Zellwände von der säurereichen Kutikula durch den ausgetretenen Zellsaft erfolgt. „Es wird also eine wässerige Lösung zwischen die beiden Membranen geschoben. Durch diese Einschaltung, die in Fig. 15, III, S. 143 auch abgebildet ist, ändert sich die elektromotorische Gesamtkraft notwendigerweise

so, daß eine Negativität der gequetschten Stelle zustande kommt" (S. 141). *Beutner* stellt sich das System wohl so vor:

KCl/Kutikula/ausgetretener Saft/säurearme Zellwand/Kutikula/KCl
1 2 3 4 5 6

Da nun 1 und 3 annähernd gleich konzentriert sind, heben sie sich elektrisch auf; es ist also gerade so, wie wenn die eine Elektrode direkt der säurearmen Zellwand angelegt wäre; sie muß also wie an einer Wunde und aus dem gleichen Grunde wie dort negativ werden.

Die *Beutner*sche Theorie des Verletzungsstromes ist bei *Höber*[1]) auch in der neuesten Auflage ohne Kritik referiert, und auch *Michaelis*[2]) (S. 182) macht keine Einwände gegen sie. Wir können nicht finden, daß sie den Tatsachen entspricht, und haben folgendes zu ihr zu bemerken:

1. Daß ein sehr ansehnlicher Konzentrationseffekt auch ohne Kutikula möglich ist, wurde oben schon zur Genüge ausgeführt; schon daraus folgt, daß *Beutner* nicht recht haben kann.

2. Wenn wirklich die Eigenschaften der *Zellhäute*, der Kutikula einerseits, der Zellwände des Fruchtparenchyms andererseits, die Bedingungen für Potentialdifferenzen abgäben, dann müßte auch am *toten* verletzten Apfel zwischen *gleichen* Ableitungsflüssigkeiten ein Strom auftreten — denn es ist nicht einzusehen, daß beim Absterben die Eigenschaften der Zellhäute sich wesentlich ändern könnten. Die verwendeten Abtötungsarten, Äther und kochendes Wasser, können nur die Entfernung des Wachses auf der Kutikula bewirkt haben. Tatsächlich beobachtet man an toten Äpfeln *durchaus keinen* Verletzungsstrom.

3. Benutzt man die Versuchsanordnung *Beutners* und bringt einen halbierten Apfel unten mit der intakten Kutikula in ein Schälchen mit n/10 NaCl und läßt in dieses auch die eine Pinselelektrode eintauchen, während die andere Pinselelektrode ebenfalls mit n/10 NaCl oben auf der Schnittfläche ruht, so kann man Potentialdifferenzen von 50 Millivolt bekommen. Wird jetzt auf die Wundfläche ein dünner Flächenschnitt des Apfels gelegt, der im wesentlichen aus Epidermis mit Kutikula besteht, so zeigt sich fast die gleiche Potentialdifferenz von 44 Millivolt. Nach Entfernung dieses Schnittes findet man 46 Millivolt. Nach abermaligem Wiederaufsetzen 44 Millivolt. Hier kann man nicht wie im „Quetschversuch" behaupten, es sei der Zusammenhang zwischen Kutikula und innerer Zellwand durch eine Flüssigkeit

[1]) *Höber*, Physik. Chem. d. Zelle, 6. Aufl., 1926, S. 728.
[2]) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration I, 2. Aufl., 1922, S. 182.

unterbrochen, da sich ja der kleine Flächenschnitt dem Fruchtfleisch dicht anpressen läßt. So zeigt der Versuch, daß trotz Einschaltung einer Kutikula in das System, die nach *Beutner* dieses wieder *symmetrisch* machen müßte, der Verletzungsstrom erhalten bleibt.

Immerhin kann man vielleicht mit *Beutner* sagen, daß der natürliche organische Zusammenhang trotz festen Anpressens des Kutikularhäutchens nicht erzielbar sei. Nun zeigt aber die mikroskopische Untersuchung einer gequetschten Stelle keineswegs immer das Bild, das *Beutner* sich von ihr gemacht hat. Nur an reifen Äpfeln tritt eine Loslösung von Zellen, also die Einschiebung von Flüssigkeit zwischen Schale und Fruchtfleisch ein, und auch hier meist nicht in großer Ausdehnung. An grünen unreifen Äpfeln aber fand ich nach starkem Quetschen den Zusammenhang aller Zellwände stets erhalten. Dennoch ist auch hier eine starke Negativität der gequetschten Stelle zu beobachten. Will man aber auch den Schatten des Verdachtes zerstören, es könnte doch irgend eine Kontinuitätstrennung erfolgt sein, so braucht man nur statt zu quetschen, lokal in anderer Weise den Apfel abzutöten. Man richtet z. B. einen feinen Strahl kochenden Dampfes auf eine kleine Stelle des Apfels. Die sofort eintretende Verfärbung beweist das Absterben. Und eine solche Stelle ist genau so negativ wie eine Quetschstelle. Mikroskopisch ist aber leicht sicherzustellen, daß keinerlei Zelltrennungen erfolgt sind. *Beutner* hat also zweifellos den Quetschversuch nicht richtig gedeutet. Die Verletzung von Zellen, vermutlich das Austreten von Saft aus ihnen, spielt hier die Hauptrolle, und es ist ganz gleichgültig, ob diese verletzte Stelle direkt der Elektrode anliegt oder durch eine Kutikula von ihr getrennt wird.

All das spricht gegen die *Beutner*sche Theorie. Im übrigen hat ja *Beutner* den Beweis für die Ähnlichkeit des verletzten Apfels mit der Nitrobenzolkette nicht etwa in der Weise erbracht, daß er die von ihm supponierten Unterschiede zwischen Kutikula und Cellulosewand wirklich erwiesen hat, sondern lediglich dadurch, daß er zeigt, daß in beiden Fällen die Potentialdifferenzen gleich groß sind. Es bedarf keiner Worte, daß ein solcher Beweis schwach ist. Auch sprechen die Tatsachen, die über die Chemie der Cellulosewand und der Kutikula bekannt sind, deutlich genug dafür, daß der Unterschied beider schwerlich in der angenommenen Richtung, ganz sicher *nicht nur* in ihr liegt.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Der Konzentrationseffekt am Apfel kann unter Benutzung sehr verschiedener „Membranen" zustande kommen. Am lebenden Apfel ist die wirksame Membran das Protoplasma. Am toten Apfel

aber zeigt sich, daß auch die Zellhäute der Parenchymzellen und die Kutikula solche Membranen sein können.

2. Die *Beutner*sche Theorie läßt den Verletzungsstrom durch den Unterschied zwischen der säurereichen Kutikula und der säurearmen Zellwand zustande kommen; sie vergleicht den Apfel mit der *Cremer*schen Nitrobenzolkette. Es ist wenig wahrscheinlich, daß die Zellwand säurearm und die Kutikula säurereich ist, und es läßt sich leicht zeigen, daß der Verletzungsstrom wohl möglich ist, auch wenn *diese* Asymmetrie fehlt. Nach *Beutner* müßte auch am toten Apfel ein Verletzungsstrom auftreten, was nicht der Fall ist, während ein Konzentrationseffekt sich hier allerdings erzielen läßt.

Eine neue Reihe Pufferlösungen mit einem p_H zwischen 2,2 und 6,0.

Von

J. M. Kolthoff und **J. J. Vleeschhouwer.**

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1926.)

1. Gewöhnlich verwendet man für das saure p_H-Bereich die *Clark*schen Pufferlösungen[1]), welche aus Kaliumbiphthalat mit Salzsäure (p_H von 2,2 bis 3,8) bzw. mit Natronlauge (p_H von 3,8 bis 6,0) hergestellt werden. Ein Vorteil ist, daß die Ursubstanz — das Kaliumbiphthalat — ziemlich leicht rein herzustellen ist. Jedoch haben die Pufferlösungen — besonders diejenigen, welche mit Salzsäure hergestellt werden — zwei Nachteile:

a) Im p_H-Gebiet von 2,8 bis 2,2 kristallisiert allmählich die Phthalsäure in großen Kristallen aus, wodurch die Reaktion sich natürlich nach der alkalischen Seite hin ändert. Besonders in den Wintermonaten tritt diese Störung schon bald nach der Herstellung der Lösungen auf.

b) Bei Anwendung der Biphthalatpufferlösungen ist Methylorange als Indikator ungeeignet. Durch eine nicht aufgeklärte Reaktion nimmt Methylorange in den Pufferlösungen eine zu saure Farbe an, wodurch man bei der kolorimetrischen p_H-Bestimmung einen um etwa p_H 0,2 zu hoch liegenden Wert findet[2]).

Daher haben wir versucht, die *Clark*sche Reihe durch eine andere geeignete zu ersetzen, und haben dazu zuletzt das System primäres Kaliumcitrat mit Salzsäure einerseits, und mit Lauge andererseits gewählt. Schon *S. P. L. Sörensen*[3]) hat bei seinen grundlegenden Untersuchungen die Citratgemische empfohlen, und zwar stellte er die Lösungen aus sekundärem Natriumcitrat mit Salzsäure bzw. Lauge her. Eine praktische Unannehmlichkeit ist, daß man die sekundäre

[1]) *W. M. Clark* und *Lubs*, Journ. of Bact. 2, 1, 109, 1917; vgl. auch *W. M. Clark*, The Determination of hydrogenions.

[2]) *J. M. Kolthoff*, Rec. Trav. chim. 45, 433, 1926.

[3]) *S. P. L. Sörensen*, diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

Natriumcitratlösung ex tempore aus Citronensäure und n Natronlauge herstellen muß. Wir haben uns daher bemüht, ein reines Citrat herzustellen und mit Hilfe dieses Salzes die Pufferlösungen zu bereiten. Für viele Laboratorien ist es sehr bequem, die Pufferlösungen ohne eingestellte Säure oder Natronlauge herzustellen und für den Zweck gut kristallisierbare reine Substanzen zu verwenden, aus denen man durch direktes Abwägen Lösungen von bekanntem Gehalt bereiten kann. Zu diesem Zweck hat der eine von uns[1]) schon Gemische von Bernsteinsäure mit Borax- bzw. primärem Kaliumphosphat mit Borax empfohlen. Bei der vorliegenden Untersuchung hat sich nun ergeben, daß man auch sehr gut derartige Pufferlösungen herstellen kann aus primärem Kaliumcitrat und Citronensäure (p_H zwischen 2,20 bis 3,60) bzw. Borax (p_H zwischen 3,80 und 6,0). Obwohl die Borsäure eine sehr schwache Säure ist, hat sie doch einen geringen Einfluß auf die Reaktion der Citratlösungen, weil sie mit denselben Komplexe bildet. Daher ist der Borax in seinem Wirkungswert nicht direkt mit der Natronlauge vergleichbar.

Die Citratpuffergemische werden bald unklar durch Pilzwachstum. *Es ist daher zu empfehlen, zu der Standardcitratlösung ein Kriställchen Thymol hinzuzufügen.*

2. *Die verwendeten Substanzen.*

Primäres Kaliumcitrat (wasserfrei): $M = 230$.

Standardlösung 0,1 mol.; d. i. 23,0 g Salz im Liter (mit ein wenig Thymol).

Herstellung des Kaliumcitrats: 420 g gewöhnliche Citronensäure werden in etwa 150 ccm warmen Wassers gelöst. Zu der Lösung fügt man in kleinen Mengen 138,2 g Kaliumcarbonat, das vorher schwach ausgeglüht und in dieser Weise wasserfrei gemacht worden ist. Nachdem die Kohlensäureentwicklung aufgehört hat, wird aufgekocht und schnell filtriert.

Bei dem Abkühlen scheidet sich das primäre Kaliumcitrat bei gestörter Kristallisation in feinen Kristallen ab. Dieselben werden abgenutscht, mit ein wenig eiskaltem Wasser nachgewaschen und nochmals umkristallisiert, wobei man ungefähr die Hälfte des Salzgewichts an Wasser nimmt. Das Monokaliumcitrat ist nämlich bei Zimmertemperatur etwa in 2 Teilen, bei der Siedetemperatur in etwa ½ Teil Wasser löslich. Bei der Umkristallisation kann daher eine gute Ausbeute erhalten werden.

Die Kristalle werden durch Absaugen gesammelt und bei etwa 80° getrocknet. Das Salz ist wasserfrei und nicht hygroskopisch. Bei einem relativen Dampfdruck von 60 Proz. zieht es noch kein Wasser

[1]) *J. M. Kolthoff*, Journ. of biol. Chem. **63**, 135, 1925.

an. Bei der Prüfung kann man fordern, daß 345 mg des Salzes auf Phenolphthalein 30,0 ccm 0,1 n Lauge verbrauchen.

Das p_H einer 0,1 mol. Lösung ist 3,68, einer 0,05 mol. Lösung 3,73.

Citronensäure ($M = 210$): $C_6H_8O_7H_2O$. Ein Handelspräparat wird ein- bis zweimal aus Wasser umkristallisiert und über zerfließendem Bromnatrium bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Prüfung auf Reinheit: vgl. *Sörensen*, l. c.[1]).

Die *Standardlösung enthält 21,0 g Citronensäure im Liter* (0,1 mol.).

Borax: Ein Handelspräparat wird zweimal aus Wasser umkristallisiert und über zerfließendem Bromnatrium bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die *Standardlösung* ist *0,05 molar* und enthält 19,06 g im Liter.

0,1 n Natronlauge bzw. 0,1 n Salzsäure sind die üblichen Reagenzlösungen der Maßanalyse.

3. *Die Messungen*: Die Messungen der Wasserstoffionenkonzentration sind alle im Thermostaten ausgeführt bei 18 bis 20⁰ mit der Wasserstoff- und zum Teil mit der Chinhydronelektrode. Dabei wollen wir bemerken, daß in den Gemischen, welche Borax enthalten, die Chinhydronelektrode nicht zu verwenden ist.

Als Vergleichselektrode dient stets eine Chinhydronelektrode im *Sörensen*schen Standardgemisch, bestehend aus 0,01 n Salzsäure und 0,09 n Kaliumchlorid ($p_H = 2,038$). Die Kompensierung geschah mit Hilfe eines ausgeeichten „*Leeds*- und *Northrup*"-Potentiometers mit einer Genauigkeit von 0,1 Millivolt.

Nachdem die verschiedenen Messungen ausgeführt waren, haben wir alle Werte in Graphiken vereinigt, und dann diejenigen Zusammensetzungen aufgesucht, in denen jedes Gemisch eine Differenz von 0,2 im p_H mit dem vorigen hatte. Nachher haben wir diese Mischungen wieder nachgeprüft.

Wir wollen noch bemerken, daß sich das p_H der Citrat-Säure bzw. Natronlaugegemische mit der Temperatur fast nicht ändert. Die angegebenen Werte in den ersten drei Tabellen sind wohl gültig für ein Temperaturbereich von 10 bis 30⁰.

0,1 molar Monokaliumcitrat mit 0,1 n Salzsäure. p_H 2,2 bis 3,8.

25 ccm Monocitrat	+ 23,05	ccm	0,1 n HCl	mit Wasser	bis	50	ccm	p_H 2,2
	+ 20,1	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 2,4
	+ 17,05	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 2,6
	+ 14,00	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 2,8
	+ 10,95	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 3,0
	+ 7,95	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 3,2
	+ 4,95	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 3,4
	+ 1,95	,,	0,1 n HCl	,,	,,	50	,,	p_H 3,6

[1]) Vgl. auch *J. M. Kolthoff*, Der Gebrauch von Farbindikatoren, 3. Aufl., 1926, S. 141.

0,1 molar Monocitrat mit 0,1 n Natronlauge (p_H 3,8 bis 6,2).

	Zusatz	p_H
25 ccm Monocitrat	+ 0,9 ccm 0,1 n NaOH mit Wasser bis 50 ccm	p_H 3,8
	+ 4,15 „ 0,1 n NaOH „ „ „ 50 „	p_H 4,0
	+ 7,55 „ 0,1 n NaOH „ „ „ 50 „	p_H 4,2
	+ 11,0 „ 0,1 n NaOH „ „ „ 50 „	p_H 4,4
	+ 14,6 „ 0,1 n NaOH „ „ „ 50 „	p_H 4,6
	+ 18,2 „ 0,1 n NaOH „ „ „ 50 „	p_H 4,8
	+ 21,65 „ 0,1 n NaOH „ „ „ 50 „	p_H 5,0
	+ 25,15 „ 0,1 n NaOH	p_H 5,2
	+ 28,3 „ 0,1 n NaOH	p_H 5,4
	+ 31,5 „ 0,1 n NaOH	p_H 5,6
	+ 34,55 „ 0,1 n NaOH	p_H 5,8
	+ 37,7 „ 0,1 n NaOH	p_H 6,0

0,1 molar Monocitrat mit 0,1 molarer Citronensäure (p_H 2,2 bis 3,8).

ccm 0,1 mol. Monocitrat	ccm 0,1 mol. Citronensäure	p_H
0,95	9,05	2,2
1,97	8,03	2,4
3,00	7,00	2,6
4,22	5,78	2,8
5,55	4,45	3,0
7,0	3,0	3,2
8,30	1,70	3,4
9,59	0,41	3,6

0,1 molar Monocitrat mit 0,05 mol. Borax.

	Zusatz	p_H
25 ccm Monocitrat	+ 0,6 ccm Borax mit Wasser zu 50 ccm	p_H 3,8
	+ 4,1 „ „ „ „ „ 50 „	p_H 4,0
	+ 8,0 „ „ „ „ „ 50 „	p_H 4,2
	+ 12,5 „ „ „ „ „ 50 „	p_H 4,4
	+ 16,7 „ „ „ „ „ 50 „	p_H 4,6
	+ 21,1 „ „ „ „ „ 50 „	p_H 4,8
	+ 25,4 „ „	p_H 5,0
	+ 28,9 „ „	p_H 5,2
	+ 32,3 „ „	p_H 5,4
	+ 35,5 „ „	p_H 5,6
	+ 38,65 „ „	p_H 5,8
	+ 41,0 „ „	p_H 6.0

Zusammenfassung.

Eine neue Reihe Citratpuffergemische mit einem p_H zwischen 2,2 und 6,0 ist beschrieben.

Dieselben werden hergestellt aus Monokaliumcitrat und Salzsäure bzw. Natronlauge, oder aus Monokaliumcitrat mit Citronensäure bzw. Borax.

Die angeführten Puffergemische bilden einen guten Ersatz für die *Clark*schen Biphthalat-Säure bzw. Lauge-Pufferlösungen.

—

Die anorganischen Bestandteile von Pankreas und Nebennieren.

Erster, physiologischer Teil.

Von

Hans Marx (Basel).

(Aus der physiologisch-chemischen und der pathologisch-anatomischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1926.)

In Versuchen, bei welchen von *N. Seiffert* (1) zum Nachweis kleinster Bleimengen eine Veraschung der Gewebe vorgenommen wurde, zeigte sich, daß, wie das schon vorher *Policard* (2) von histologischen Gesichtspunkten aus festgestellt hatte, in den verschiedenen vollkommen veraschten Schnitten die Struktur der Gewebe so vollkommen erhalten war, daß die mikroskopische Diagnose jeder Gewebsart leicht gestellt werden konnte. Diese Beobachtungen sind in der physiologisch-chemischen Anstalt weiter verfolgt worden, und *E. Tschopp* hat hierüber in v. Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie eingehend berichtet, besonders auch über seine erfolgreichen Versuche, in derartigen histologischen Schnitten die einzelnen anorganischen Bestandteile durch spezifische Reaktionen festzulegen. Aus allen diesen Erfahrungen ergibt sich jedenfalls die eine Tatsache unzweifelhaft, daß ganz unabhängig von der Menge organischer Materie, deren Gehalt, wie oft nachgewiesen wurde, stark wechselt, offenbar der *anorganische Aufbau der Gewebe eine spezifische Eigenart* erkennen läßt.

Es erhebt sich naturgemäß die Frage, ob also eine anorganische Spezifität auch auf chemischem Wege festzustellen ist. Die in der Literatur vorhandenen Angaben sprechen durchaus nicht in diesem Sinne, ja man kann sogar sagen, daß die uns durch die Veraschungsmethode histologischer Bilder nahegelegte Auffassung von einem spezifischen und charakteristischen Aufbau der Gewebe durch die bisher vorliegenden Analysen durchaus nicht bestätigt wird. Man braucht nur die in den Lehrbüchern angegebenen Zahlen durchzusehen, um das Unerwartete der Veraschungsbefunde zu erkennen. Um einige Daten für die von mir untersuchten Organe zu geben, beträgt nach den Angaben, auf die ich weiter unten zu sprechen komme, der Aschengehalt eines Pankreas nach den Untersuchungen von *Gossmann* (3) bei einem

Manne 18 Prom. und bei einer Frau nur 13 Prom., ebenso berechnet sich z. B. das Verhältnis Ca zu Mg im Pankreas beim Manne auf das Doppelte wie bei der Frau, oder es ist nach den Untersuchungen von *Lüning* (4) bei dem einen Pankreas dieses selbe Verhältnis das 2½fache des anderen.

Es lag immerhin die Möglichkeit vor, daß hier Zufälligkeiten (wenn wir von Analysenfehlern ganz absehen) eine große Rolle spielen. Es erwies sich daher als wünschenswert, diese Untersuchungen neu aufzunehmen, da wir gegenüber den früheren Untersuchungen zwei methodische Fortschritte heranziehen können. Zunächst sind in den letzten Jahren die Bestimmungsmethoden derartig verfeinert worden, daß mit sehr viel kleineren Quantitäten schon exakt stimmende Werte zu erzielen sind bzw. die Genauigkeit derartiger Analysen dank auch beträchtlicher Vereinfachung erheblich zugenommen hat. Vielleicht noch wichtiger ist aber die Tatsache, daß durch das neue von *Krause* erfundene Verfahren die Trocknung der Organe außerordentlich verbessert worden ist, was gerade für derartige Analysen als ein ganz besonderer Fortschritt zu buchen ist, da ja bekanntlich gerade die Trocknung der Gewebe außerordentliche Schwierigkeiten bereitet. Ich darf aber gleich an dieser Stelle schon vorwegnehmen, daß Analysen aus frischen Organen mir Zahlen gaben, die mit denjenigen an „Krausepräparaten“ gut übereinstimmten. Damit ist experimentell gezeigt, daß das Krauseverfahren für die Trocknung ganz Vorzügliches leistet, wie das ja auch schon durch physiologische Untersuchungen festgestellt ist. Für die Analyse von Organen aber ist die Verwendung derartiger Pulver ein sehr großer Vorteil, weil es auf diesem Wege gelingt, Organe verschiedener Herkunft gut miteinander zu mischen bzw. Durchschnittswerte aus einer größeren Zahl von Exemplaren desselben Organs zu erhalten. Deshalb wurden die Untersuchungen hauptsächlich an solchen Krausepulvern vorgenommen. Natürlich ist nicht anzunehmen, daß eine Deponierung anorganischer Stoffe nicht ebensogut möglich ist, wie die von organischen Stoffen, ja gewisse Erfahrungen, wie z. B. über den Kieselsäuregehalt des Pankreas [*Rössle* (5)] und ähnliche [*Kahle* (6)], sprechen für eine physiologisch und pathologisch vermutlich außerordentlich wichtige Variabilität. Das gibt ein Arbeitsprogramm, auf das wir noch zurückkommen wollen. Aber bevor man derartige pathologische Veränderungen studiert, muß zunächst einmal festgestellt werden, besteht für die wichtigsten Elementarbausteine der Zelle, die in größerer und charakteristischer Menge am Aufbau der Zelle beteiligt sind, bezüglich ihres Vorkommens irgendwelche Gesetzmäßigkeit? Der Organismus strebt ja doch auf Grund einer für ihn charakteristischen Regel („Bildungsmelodie“, *K. E. von Baer*, „raumzeitliche Regel“, *Petersen*) für alle seine Organe

einem bestimmten Funktionszustand und damit einem bestimmten Aufbau zu, der in dem Wechsel von Assimilation und Dissimilation gewissermaßen die statische Architektur der Organe darstellt.

Ich bin also daran gegangen, in einzelnen Organen den Aschengehalt quantitativ zu bestimmen, und ich habe, als sich herausstellte, daß ein Teil der anorganischen Bestandteile relativ leicht durch organische Lösungsmittel extrahiert werden kann, auch diese noch in den Kreis meiner Betrachtung hineingezogen, da zwischen den einzelnen Fraktionen der Lipoide, den Phosphatiden und dem Cholesterin nicht nur ein ähnliches Gleichgewicht zu bestehen scheint wie zwischen den einzelnen Kationen, sondern auch weil jede dieser Gruppen bezüglich ihres funktionellen Verhaltens mit bestimmten Kationen in Beziehung gebracht worden ist.

Als Material für die Untersuchungen kamen zunächst frische Organe in Betracht. Weiter aber erwies es sich als sehr vorteilhaft, wie oben bereits auseinandergesetzt wurde, die trockenen Organpulver zu verwenden, welche nach dem Krauseverfahren in so schonender Weise hergestellt sind, daß eine Zersetzung dabei vermutlich auf ein Minimum eingeschränkt ist.

Angewandte Untersuchungsmethoden.

Zur Bestimmung der *Kationen* ($Na^{\cdot}$, $K^{\cdot}$, $Ca^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$) wurde mit rauchender Salpetersäure zum Teil in Kombination mit Wasserstoffsuperoxyd verascht, die Salpetersäure vertrieben und die Asche in einem gemessenen Volumen Wasser gelöst. Das *Natriumion* wurde nach der *Tschopp*schen (7) titrimetrischen Halbmikromethode bestimmt. Das Natriumion wird als schwerlösliches Natrium-Cäsium-Wismutnitrit gefällt und der Niederschlag mit Kaliumpermanganat oxydiert. Bei peinlich genauem Arbeiten ergab die Methode befriedigende Resultate. Die Bestimmung des *Kaliumions* wurde nach *Kramer* und *Tisdall* (8) vorgenommen. Das Kaliumion wird als Komplexsalz (Kobalt-Kaliumnitrit) gefällt, der Niederschlag durch oxydimetrische Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt. Ebenfalls nach *Kramer* und *Tisdall* (9) wurde das *Calciumion* bestimmt. Mit Ammoniumoxalat wird das Calcium gefällt, die aus dem Niederschlag durch Schwefelsäure in Freiheit gesetzte Oxalsäure mit Permanganat titriert.

Zur *Magnesium*bestimmung wurde die von *Gadient* (10) angegebene Methode angewandt. In der vom Calcium befreiten Lösung wird phosphorsaures Ammoniakmagnesium ausgefällt, die Phosphorsäure kolorimetrisch bestimmt und daraus das Magnesium berechnet.

Von den *Anionen* wurden Chlor und Phosphor bestimmt. Schwierigkeiten machte die Chlorbestimmung. Die trockene Veraschung gab keine befriedigenden Resultate; die neuerdings von *Marianne Richter-Quittner* (11) empfohlene Veraschung auf nassem Wege mit Salpetersäure gab mir auch keine guten Werte. Am besten bewährte sich das folgende der *Bang*schen Methode (12) analoge Verfahren: etwa 50 mg Substanz wurden durch Stehenlassen über Nacht mit Wasser ausgelaugt und in einem Teil dieses Wassers das Chlor nach *van Slyke* und *Donleavy* (13) bestimmt. Die Methode ließ sich gut anwenden bei dem äußerst fein gemahlenen Krausepulver.

Zur *Phosphorbestimmung* wurde die Substanz mit Salpetersäure und Schwefelsäure feucht verascht und der Phosphor nach der von *Briggs* (14) modifizierten Methode von *Doisy* und *Bell* (15) bestimmt.

Die Stickstoffanalysen wurden nach *Kjeldahl* ausgeführt, und zwar nach den Vorschriften von *Pregl* (16).

Sämtliche angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus Doppelanalysen.

Anorganische Bestandteile.

A. Nebenniere.

I. *Frisches Organ.* Die frischen Nebennieren stammten von einem 34jährigen gesunden Manne, der durch Stichverletzung in das Abdomen ums Leben gekommen war. Es wurden nur die Kationen bestimmt. Alle Zahlen wurden auf 100 g Frischgewicht umgerechnet. Division durch das Atomgewicht ergab die in der zweiten Rubrik stehenden Milligramm-Molwerte.

Na	44,06 mg	1,916 mg-Mol
K	103,10 „	2,636 „
Ca	15,60 „	0,389 „
Mg	9,86 „	0,405 „

II. *Pulver* auf 100 g Trockenpulver gefunden.

Na	246,21 mg	10,71 mg-Mol
K	610,43 „	15,61 „
Ca	101,29 „	2,528 „
Mg	61,02 „	2,508 „

Aus dem Verhältnis Frischorgan : Pulver berechnet sich der Wassergehalt der Nebennieren zu 83,48 Proz. In der Literatur habe ich keine Angaben über den Wassergehalt der Nebennieren gefunden. Stellt man die Quotienten K : Ca, Ca : Mg, K : Na von frischem Organ und Pulver einander gegenüber, so ergibt sich eine auffallende Übereinstimmung. Die Quotienten wurden aus den Milligramm-Molzahlen berechnet.

K : Ca	6,77	frisches Organ	6,18 Pulver
Ca : Mg	0,96	„ „	1,031 „
K : Na	1,376	„ „	1,458 „

Pulver : Frischorgan. K : Ca 1,096, Ca : Mg 1,074, K : Na 1,060. Im Pulver wurden auch die Anionen Cl′ und P‴ bestimmt. Für Cl berechnet sich der Wert für 100 g auf 302 mg. Für PO_4 (gesamter Phosphor) auf 1026 mg.

B. Pankreas.

I. Frisches Organ. 34jähriger Mann.

Na	87,14 mg	3,79 mg-Mol
K	226,3 „	5,79 „
Ca	14,46 „	0,36 „
Mg	27,46 „	1,13 „

II. Pulver.

Na	271,8 mg	11,82 mg-Mol
K	1044,26 „	26,71 „
Ca	62,21 „	11,55 „
Mg	93,76 „	3,855 „

Aus dem Verhältnis Frischorgan: Pulver berechnet sich der Wassergehalt des Pankreas zu 74,8 Proz. Im Handbuch der Biochemie, herausgegeben von *Oppenheimer* (17), finden sich folgende Angaben über den Wassergehalt des Pankreas: 78 Proz. nach *Bottazzi-Boruttau*, 72,7 Proz. nach *Magnus-Levy*. Auch hier findet man bei Gegenüberstellung der Quotienten K : Ca, Ca : Mg und K : Na von frischem Organ und Pulver ausreichende Übereinstimmung.

K : Ca.	16,03 frisches Organ	17,20 Pulver
Ca : Mg	0,32 „ „	0,40 „
K : Na	1,53 „ „	2,26 „

Pulver : Frischorgan. K : Ca 1,07, Ca : Mg 1,25, K : Na 1,47. Im Pulver wurde gefunden für Cl 313,9 mg, für PO_4 (gesamter Phosphor) 1007,4 mg.

Diese Resultate sind deshalb bemerkenswert, weil nach den früheren Angaben die anorganische Zusammensetzung zwischen Mensch und Tier einerseits und zwischen den einzelnen Menschen andererseits, z. B. zwischen Mann und Weib ganz verschieden ist. Nicht nur der Gesamtaschengehalt, sondern auch die Verhältnisse K : Ca, Ca : Mg, K : Na schwanken in weiten Grenzen. Ich führe aus den Arbeiten von *Gossmann* (18) und von *Lüning* (19) folgende Zahlen an.

Gossmann: auf 1000 Teile berechnet (Pankreas).

Asche:	Mann	17,92	: Kuh	6,77	=	2,62
	Weib	13,05	: Kuh	6,77	=	1,93
	Mann	17,92	: Weib	13,05	=	1,37

Ca : Mg Kuh 3,89, Mann 2,89, Weib 1,44. Ca : Mg Mann : Weib = 2,52.

Lüning:

K : Na	0,492 Pankreas I	0,349 Pankreas II		
Ca : Mg	1,05 „ I	2,78 „ II	=	2,65

Für den Gesamtaschengehalt kann ich keine direkten Angaben machen; immerhin berechnet sich aus den einzelnen Bestandteilen ein ziemlich übereinstimmender Wassergehalt; aber aus den vorhin angeführten Zahlen ergibt sich, daß das gegenseitige Ionenverhältnis fast identisch ist. Daraus geht hervor, daß der gleichen Funktionsweise ein gleiches Verhältnis entspricht. Auch daraus erhellt, daß die anorganischen Bestandteile nicht gleichgültig sind und in ihren gegenseitigen Verhältnissen — im Gegensatz zum Fett — konstant sind. Zum Vergleich stelle ich die Resultate der beiden untersuchten Krauseorganpulver nebeneinander. Bei den Frischorganwerten treten die Unterschiede wegen des verschiedenen Wassergehalts nicht so deutlich hervor.

	Nebenniere		Pankreas	
	mg	mg-Mol.	mg	mg-Mol.
Na	246,21	10,71	271,8	11,82
K	610,43	15,61	1044,26	26,71
Ca	101,29	2,58	62,21	1,55
Mg	61,02	2,50	93,76	3,855
Cl	302,0	8,54	313,9	8,85
PO_4	1026,0	—	1007,4	—
H_2O (ber.)	83,48 Proz.	—	74,8 Proz.	—

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeichnet sich das *Pankreas gegenüber der Nebenniere durch hohen Kaliumgehalt aus.* Geringer sind die Differenzen im Calcium-, Magnesium- und Wassergehalt. Es findet sich *im Pankreas gegenüber der Nebenniere Zunahme des Magnesiums, Abnahme des Calciums und des Wassers.* Eine eigenartige Ausnahme bildet das *Natrium*. Es ist in beiden Organen *fast gleich*.

Extraktionsversuche.

Die Untersuchungen über die Lipoide der beiden von mir studierten Organe gelten bisher wesentlich der Isolierung und Charakterisierung der in Betracht kommenden Stoffe. Mir kam es zunächst hauptsächlich nur auf eine Fraktionierung an, einerseits, um das Verhältnis von Stearinen zu Phosphatiden, die ja, wie in der Einleitung hervorgehoben, funktionell zu den Kationen in Beziehung stehen, festzustellen, andererseits, weil schon bei den ersten Versuchen sich ergeben hatte, daß ein Teil der Kationen selbst in relativ konzentriertem Alkohol löslich ist. Die Aufeinanderfolge der einzelnen Extraktionsmittel ist bei den einzelnen Autoren [*Goldschmidt*, *Wagner*, *Beumer*, *Alexander*, *Borberg* (20)] verschieden, ich bin der von *Gorodissky* (21) angegebenen Methodik gefolgt. Es werden drei Extraktionen vorgenommen: Aceton, Petroläther, absoluter Alkohol. Da ich nicht mit Milligrammen, sondern mit Grammen arbeitete, wurden die Extraktionszeiten bedeutend verlängert. Sämtliche Extraktionen wurden in einem Soxhletapparat bei der entsprechenden Siedetemperatur ausgeführt.

A. Nebenniere.

I. 14stündige Extraktion mit Aceton. Von 4,3280 g gingen 0,9425 g ins Aceton über. Der Acetonextrakt war dunkelbraun gefärbt, in der Kälte fiel eine braune Substanz in Flocken aus.

II. 24stündige Extraktion mit Petroläther. In diesen Extrakt gingen 0,4731 g über. Der Extrakt war farblos.

III. 10stündige Extraktion mit Alkohol absolutus. In diesen Extrakt gingen 0,2579 g über. Der Extrakt war dunkelbraun gefärbt; in der Kälte fiel eine hellbraune Substanz aus. Von 4,3280 g waren zusammen extrahierbar 1,6735 g oder 38,67 Proz.

Auf die Extrakte entfallen:

I. Aceton	56,3 Proz.
II. Petroläther	28,3 „
III. Alkohol abs.	15.4 „

Von 100 g sind extrahiert 38,67 Proz.

Von diesen entfallen:

56,3 Proz.	auf Aceton	= 21,78 g
28,3 „	„ Petroläther	= 10,92 g
15,4 „	„ Alkohol abs.	= 5,95 g

Zum Vergleich führe ich noch zwei Extraktionsversuche an: Extraktion mit 92 proz. Alkohol und dann mit Äther. Von 2,0215 g gingen 0,7274 g in die Extrakte über, oder 35,98 Proz. Extraktion mit 92 proz. Alkohol: von 1,2218 g gingen 0,4945 g in den Extrakt über, oder 40,47 Proz. Die Nebenniere liefert also im Durchschnitt 38 Proz. extrahierbare, das heißt in Äther, Alkohol usw. lösliche Substanzen. *Biedl* gibt ein Drittel der Trockensubstanz an.

In den verschiedenen Extraktionsfraktionen wurden jeweils Stickstoff und Phosphor bestimmt; im Acetonextrakt auch das Cholesterin.

I. Acetonextrakt. Der Extrakt wurde filtriert; das auf 250 ccm gebrachte Filtrat und die ausgefallene Substanz wurden für sich untersucht. Aschenbestandteile waren keine nachweisbar.

Filtrat	0,8704 g
Ausgefallen	0,0721 g

Im Filtrat	P	1,765 mg
	N	19,9169 „
Im Ausgefallenen	P	0,177 „
	N	3,821 „
Zusammen	P	1,942 mg
	N	23,737 „

Cholesterinbestimmung. Nach den Angaben von *Gorodissky* geht das Cholesterin quantitativ in den Acetonextrakt über. Die Bestimmungen wurden nach der der *Liebermann-Burchard*schen Reaktion nachgebildeten kolorimetrischen Methode ausgeführt. Das Aceton wurde durch Erwärmen auf dem Wasserbad verjagt, im Rückstand das Cholesterin bestimmt.

Freies Cholesterin 50 mg.

Zur Bestimmung des in Esterform vorhandenen Cholesterins wurde der nach dem Verdampfen des Acetons verbliebene Rückstand 5 Stunden mit 20 proz. Kalilauge verseift. Die Bestimmung ergab für Cholesterin + Cholesterinester = Gesamtcholesterin 284,1 mg.

Um Vergleiche ziehen zu können, habe ich meine Resultate auf 100 g Pulver umgerechnet. Von 100 g Pulver 38,67 Proz. extrahierbar, davon 56,3 Proz = 21,78 g im Aceton und darin 6,575 g Cholesterin, oder vom extrahierbaren sind 17,0 Proz. Cholesterin.

Aus der zahlreichen Literatur über Nebennierenlipoide führe ich die Zahlen von *Borberg* (22) an. Er gibt für Cholesterin folgende Werte:

Vom Extrakt 8,8 bis 35,5 Proz. Cholesterin, Mittelwert 21,06 Proz. Die absoluten Zahlen aus seinen Angaben auf 100 g berechnet, ergeben 7,812 g, 1,994 g, 7,818 g, 7,094 g, 1,5 g. Es ist zu bemerken, daß *Borberg* nur die Rinde der Nebenniere untersucht hat. Große Verschiedenheiten finden sich in den Angaben darüber, ob das Cholesterin als solches oder als Ester vorhanden sei. *Rosenheim* und *Tebb* (23), die eine große Menge (25 kg) Nebennieren untersuchten, geben an, daß sie kein freies Cholesterin, selbst nicht mit der sehr feinen *Windaus*schen Digitoninmethode nachweisen konnten. *Goldschmidt* fand Cholesterin als solches und keine Cholesterinester. *Beumer* gibt an, daß das Cholesterin sich fast nur in freiem Zustande finde und nur ein sehr kleiner Teil in gebundener Form als Cholesterinester. Ich fand sowohl freies Cholesterin als Cholesterinester. Ich glaube, daß die verschiedenen Befunde von der Trocknungsmethode bzw. Art und Dauer der Aufbewahrung abhängen.

II. Petrolätherextrakt. Es gingen in diesen Extrakt 0,4731 g über. Nach *Beumers* Angaben geht in diese Fraktion eine Substanz über vom Verhältnis P : N wie 1 : 1, und er deutet sie als Lecithin. Infolge eines Mißgeschickes konnten die P- und N-Bestimmungen in dieser Fraktion nicht ausgeführt werden.

III. Alkoholextrakt. In diese Fraktion gingen 0,2579 g über; eine Substanz fiel in kleinen braunen Flöckchen aus; ihr Gewicht betrug 0,0182 g. Es wurde filtriert, das völlig klare Filtrat enthielt noch 0,2397 g. Von dem Ausgefallenen konnten keine Analysen gemacht werden. Im Filtrat ergaben die Bestimmungen für:

P 2,07 mg (für den ganzen Extrakt aus
N 12,52 „ den Analysen berechnet).

Im Alkoholextrakt wurden Aschenbestandteile nachgewiesen und bestimmt.

Der nach allen Extraktionen zurückgebliebene Rückstand wurde auf seine anorganischen Bestandteile untersucht. Es fand sich das *Calcium* quantitativ im Rückstand auf 100 g Pulver berechnet 100,7 mg; vgl. die frühere Angabe: 101,29 mg (S. 419). Ebenfalls quantitativ konnte ich das *Magnesium* im Rückstand nachweisen; auf 100 g Pulver 61,70 mg; vgl. die frühere Angabe: 61,02 mg (S. 419). Das will besagen, daß Calcium und Magnesium in einer Alkohol absolutus völlig unlöslichen Form vorhanden sind. Beim Kalium fand sich ein alkohollöslicher und ein alkoholunlöslicher Teil:

Alkohollösliches Kalium. . . . . . . 218,6 mg
Alkoholunlösliches Kalium . . . . . 391.5 „

B. Pankreas.

Parallel mit den Extraktionen und Analysen der Nebenniere wurden diejenigen des Pankreas durchgeführt.

I. 14stündige Extraktion mit Aceton. Von 3,8504 g gingen 1,6479 g in das Aceton über. Der Acetonextrakt war strohgelb gefärbt, in der Kälte fiel eine fettig aussehende Substanz aus.

II. 24stündige Extraktion mit Petroläther. In diese Fraktion gingen 0,1250 g über, der Extrakt war farblos.

III. 10stündige Extraktion mit Alkohol absolutus. Es wurden 0,7412 g gelöst. Der Extrakt zeigte nach dem Abfiltrieren einer flockigen wachsartigen Masse eine schöne gelbe Farbe.

Von 3,8504 g waren zusammen extrahierbar 2,5141 g oder 65,3 Proz. (Nebenniere 38,67 Proz., S. 419).

Auf die einzelnen Fraktionen entfallen:

I. Aceton	65,5 Proz.	(56,3 Proz.)
II. Petroläther	5,0 „	(28,3 „)
III. Alkohol abs.	29,5 „	(15,4 „)

Die entsprechenden Zahlen der Nebennieren sind zum Vergleich in Klammern beigefügt.

Von 100 g sind extrahierbar 65,3 Proz. Von diesen entfallen:

65,5 Proz. auf Aceton	=	42,77 g	(21,78 g)
5,0 „ „ Petroläther	=	3,26 g	(10,92 g)
29,5 „ „ Alkohol abs.	=	19,27 g	(5,95 g)

I. Acetonextrakt. Der Gesamtextrakt wurde filtriert; der Filterrückstand und das Filtrat getrennt untersucht. Es waren keine Aschenbestandteile nachweisbar.

Filtrat	1,3153 g	
Ausgefallen	0,3326 g	
Im Filtrat		P 1,083 mg
		N 44,82 „
Im Ausgefallenen		P 0,244 „
		N 33,16 „
Zusammen		P 1,327 mg
		N 77,98 „

Im Vergleich mit der Nebenniere ist der Acetonextrakt des Pankreas bedeutend N-reicher und etwas P-ärmer.

Cholesterinbestimmung:	freies Cholesterin	34,91 mg
	Gesamtcholesterin	87,74 „

Auf 100 g Pulver umgerechnet: 1,109 g Cholesterin oder 2,60 Proz. vom Extrahierbaren sind Cholesterin (6,575 g, 17,0 Proz. bei der Nebenniere).

II. Petrolätherextrakt. In diese Fraktion gingen 0,1250 g über. Anorganische Bestandteile waren keine nachweisbar.

III. Alkoholextrakt. Diese Fraktion enthielt insgesamt 0,7412 g, davon fielen aus 0,1726 g, es blieben im Filtrat 0,5686 g.

Im Filtrat	P 2,659 mg	(2,07 mg)
	N 48,0 „	(12,52 „)
Im Ausgefallenen	P 0,73 „	
	N 12,61 „	
Zusammen.	P 3,389 mg	
	N 60,61 „	

Wie bei der Nebenniere, fanden sich im Alkoholextrakt anorganische Bestandteile. Der nach allen Extraktionen zurückgebliebene Rückstand wurde auf seine anorganischen Bestandteile untersucht. Es fanden sich die gleichen Verhältnisse wie bei der Nebenniere, Calcium und Magnesium wurden quantitativ im Rückstand nachgewiesen, *vom Kalium war ein Teil im Alkohol löslich.*

Auf 100 g Pulver Ca 66,16 (vgl. die frühere Angabe 64,21 mg, S. 419); Mg 94,0 mg (vgl. die frühere Angabe 93,76 mg.)

Alkohollöslich	K 366,0 mg
Alkoholunlöslich	K 670,46 „

Nach einem ersten Extraktionsversuch hatte es den Anschein, als ob ein Teil der anorganischen Bestandteile durch organische Lösungsmittel leicht extrahiert werden könnte, und zwar entsprechend dem Lipoidgehalt. Zur Kontrolle wurde noch einmal eine Extraktion des Pulvers mit 92proz. Alkohol angesetzt und im Alkoholextrakt und im Rückstand die Kationen bestimmt. Es ergab sich die folgende Fraktionierung.

	Nebenniere		Pankreas	
	Proz.	mg	Proz.	mg
Ca alkohollöslich	11,35	11,91	14,2	8,84
Ca alkoholunlöslich . . .	88,65	92,84	85,8	55,4
Mg alkohollöslich	28,94	18,08	31,4	29,44
Mg alkoholunlöslich . . .	70,98	44,41	68,6	73,52
K alkohollöslich	37,55	231,8	39,43	410,6
K alkoholunlöslich	62,44	385,6	60,57	632,0

Die Übereinstimmung in der Extrahierbarkeit der anorganischen Bestandteile ist in die Augen springend, so auffallend die früher angeführten Unterschiede in der Extrahierbarkeit der fettartigen Substanzen sind. Es ist anzunehmen, daß die Löslichkeit der anorganischen Bestandteile, abgesehen von den Chloriden, auf den Wassergehalt des 92proz. Alkohols zurückzuführen ist.

Im Handbuch der Biochemie (24) geben *H. Aron* und *R. Gralka* über den anorganischen Gehalt von Pankreas und Nebenniere folgende Werte. Meine Zahlen sind in Klammern beigefügt.

Pankreas.

Hund:	Cl 51	mg	auf 100 Teile frischer Substanz.
Mensch:	CaO . 100 bis 222	„	auf 1000 Teile frischer Substanz
	Ca . . 71,5 „ 158,5	„	(144,6),
Mensch:	MgO 280	„	auf 1000 Teile frischer Substanz
	Mg 168,9	„	(275).

Nebenniere.

Hund:	Cl 200	mg	auf 100 Teile frischer Substanz.

Bei *Magnus-Levy* (25) fand ich folgende Zahlen für Pankreas:

Cl	161	mg	in 100 g frischer Substanz.
Ca	15,9	„	in 100 g frischer Substanz (14,46).
Mg	16,8	„	in 100 g frischer Substanz (27,46).

In den Tabellen I, II und III fasse ich die wesentlichen Resultate kurz zusammen. Ihnen ist vielleicht darum eine gewisse Bedeutung zuzusprechen, da sie einerseits an menschlichen Organen gewonnen wurden, andererseits an einem fabrikmäßig hergestellten Pulver, das von vielen Exemplaren herrührt und so Durchschnittswerte ermöglicht.

Tabelle I.

Anorganische Bestandteile.

	Nebenniere				Pankreas			
	Frisch		Pulver		Frisch		Pulver	
	mg/100	mg-Mol	mg/100	mg-Mol	mg/100	mg-Mol	mg/100	mg-Mol
$Na^{\cdot}$	44,06	1,916	246,21	10,71	87,14	3,79	271,8	11,82
$K^{\cdot}$	103,1	2,636	610,43	15,61	226,3	5,79	1044,26	26,71
$Ca^{\cdot\cdot}$	15,60	0,389	101,29	2,528	14,46	0,36	62,21	1,55
$Mg^{\cdot\cdot}$ . . .	9,86	0,405	61,02	2,508	27,46	1,13	93,76	3,855
Cl'	—	—	302,0	8,537	—	—	313,9	8,850
PO_4 (ges.) .	—	—	1026,0	—	—	—	1007,4	—
K : Ca . .	6,77		6,18		16,03		17,20	
Ca : Mg . .	0,96		1,031		0,32		0,40	
K : Na . .	1,376		1,458		1,53		2,26	

Tabelle II.

Extrahierbarkeit.

	Nebenniere Proz.	Pankreas Proz.
Von 100 g extrahierbar . . .	38,67	65,3
Davon entfallen auf:		
Aceton	56,3	65,5
Petroläther	28,3	5,0
Alkohol abs.	15,4	29,5

Tabelle III.
Fraktionierung der Kationen.

	Nebenniere				Pankreas			
	Alkohollöslich		Alkoholunlöslich		Alkohollöslich		Alkoholunlöslich	
	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg	Proz.	mg
Ca . .	11,35	11,91	88,65	92,84	14,2	8,84	85,8	55,4
Mg . .	28,94	18,08	70,98	44,41	31,4	29,44	68,6	73,52
K . .	37,55	231,8	62,44	385,6	39,43	410,6	60,57	632,0

Als allgemeines Resultat möchte ich hervorheben, daß nach diesen Erfahrungen das Verhältnis K : Ca im Pankreas ein sehr viel höheres ist als in der Nebenniere, so daß also zwischen den einzelnen Organen sicher Differenzen in der anorganischen Zusammensetzung bestehen. Da der Stickstoffgehalt in der fettreichen Trockensubstanz in der Hauptsache der gleiche ist, geht auch aus den vorliegenden quantitativen Bestimmungen klar hervor, wie wesentlich für den charakteristischen Aufbau der Gewebe ihr spezifischer Gehalt an anorganischen Stoffen ist.

Literatur.

1) *N. Seiffert*, Inaug.-Diss. Basel 1924. — 2) *Policard*, La micro-incinération et son intérêt dans les recherches histochimic. — 3) *Gossmann*, Inaug.-Diss. Erlangen 1898. — 4) *Lüning*, Inaug.-Diss., Würzburg 1899. — 5) *R. Rössle*, Münch. med. Wochenschr. **61**, 756, 1914. — 6) *Kahle*, ebendaselbst **61**, 752, 1914; Beitr. z. Klin. der Tuberk. **47**, 296, 1921. — 7) *E. Tschopp*, Helv. Chim. Acta **8**, 893, 1925. — 8) *Kramer* und *Tisdall*, Journ. biol. Chem. **46**, 339, 1921. — 9) *Dieselben*, ebendaselbst **47**, 475, 1921. — 10) *Gadient*, Helv. Chim. Acta **6**, 729, 1923. — 11) *M. Richter-Quittner*, diese Zeitschr. **158**, 176, 1925. — 12) *J. Bang*, Mikromethode der Blutuntersuchung. München und Wiesbaden. — 13) *van Slyke* and *Donleavy*, Journ. of biol. Chem. **37**, 55, 1919. — 14) *Briggs*, ebendaselbst **53**, 13, 1922. — 15) *Doisy* and *Bell*, ebendaselbst **44**, 55, 1920. — 16) *F. Pregl*, Quantitative organ. Mikroanalyse 1923, S. 113. — 17) *Oppenheimer*, Handb. d. Biochem., 2. Aufl. Jena 1924. — 18) *Gossmann*, Inaug.-Diss. Erlangen 1898. — 19) *Lüning*, Inaug.-Diss. Würzburg 1899. — 20) *Goldschmidt*, Inaug.-Diss. Straßburg 1910; *R. Wagner*, diese Zeitschr. **64**, 72, 1914; *Beumer*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **77**, 304, 1914; *Alexander*, Zieglers Beitr. **11**, 145, 1892; *Borberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **32**, 287, 1915. — 21) *H. Gorodissky*, diese Zeitschr. **159**, 397, 1925. — 22) *Borberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **32**, 287, 1915. — 23) *Rosenheim* and *Tebb*, Journ. of Physiol. **37**, 38. — 24) *Oppenheimer*, Handb. d. Biochem. **1**, 2. Aufl. Jena 1924. — 25) *Magnus-Levy*, diese Zeitschr. **24**, 363, 1910.

Zur Kenntnis der Reduktionswirkung des bei der Dialyse verwendeten Pergamentpapiers.

Von

A. Gutbier †, B. Ottenstein und W. Jehring.

(Aus der kolloidchemischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums der Universität Jena[1]).)

(Eingegangen am 23. Oktober 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Gelegentlich von Dialysierversuchen an organischen, ammoniakhaltigen farblosen Silbersalzlösungen[2]) machten wir die Beobachtung, daß bereits nach 24 Stunden innerhalb der Membran des vor Licht geschützten Dialysators eine Gelbfärbung der Flüssigkeit auftrat, die auf die Bildung von *kolloidem* Silber zurückzuführen war. Diese Tatsache ließ die Annahme naheliegen, daß bei der Dialyse von dem Pergamentpapier selbst Stoffe abgegeben werden, die *reduzierende* Eigenschaften besitzen, eine Vermutung, die wir, wie im folgenden gezeigt wird, auch experimentell zu bestätigen vermochten.

Daß bei der Dialyse kolloider Systeme das verwendete Pergamentpapier nicht ohne Einfluß ist, geht aus Untersuchungen von *R. Zsigmondy*[3]) hervor, der Goldsole nach erfolgter Dialyse sehr weitgehend konzentrieren konnte und als Grund dafür angibt, daß die Pergamentmembran kolloide, stabilisierend wirkende Stoffe abgibt. Auch *Wo. Pauli*[4]) stellt fest, daß bei energischer Dialyse im Faltendialysator Bestandteile des Pergamentpapiers — nach seiner Auffassung im wesentlichen Kohlehydrate — abgegeben werden und daß diese Stoffe zum Teil adialysabel, also kolloidaler Natur sind.

---

[1]) Vorliegende Arbeit wurde mit Herrn Prof. *A. Gutbier* fertiggestellt, aber erst nach seinem Tode druckfertig gemacht.

[2]) *W. Jehring*, Inaug.-Diss. Jena 1926.

[3]) Kolloidchemie, S. 97, Anm. 1. Leipzig 1912.

[4]) Kolloidchemische Beihefte **21**, 198, 1926.

Für uns war von besonderem Interesse die Frage nach der *Reduktionswirkung* der wasserlöslichen Bestandteile des Pergamentpapiers.

Zur Charakteristik des in diesem Sinne untersuchten Pergamentpapiers von Schleicher und Schüll „Zur Dialyse C 155 : 100" wurden zunächst folgende Untersuchungen angestellt:

Je 100 qcm des bei 105° getrockneten und gewogenen Pergamentpapiers wurden einmal sofort — ein andermal nach vorheriger vierstündiger Extraktion mit siedendem Wasser verascht:

	Ursprüngl. Gewicht g	Gewicht nach der Extraktion g	Gewichtsverlust Proz.	Aschegehalt g	Aschegehalt Proz.
Unbehandeltes Papier	1,5202	—	—	0,0032	0,210
Behandeltes Papier .	1,4390	1,4158	1,65	0,0030	0,208

Der Gewichtsverlust von 1,65 Proz., den das Papier durch die Extraktion erleidet, dürfte also hauptsächlich durch die Abgabe *organischer* Bestandteile bedingt sein, da die äußerst geringe Entaschung von 0,002 Proz. darauf schließen läßt, daß der Gehalt an aschebildender Substanz sich kaum erniedrigt hat.

Ferner wurde die aus wässerigen Extrakten, die wir durch sechstägiges ruhiges Stehenlassen von Pergamentpapier unter destilliertem Wasser erhielten, durch Eindampfen zur Trockne gewonnene organische Substanz auf ihren Stickstoffgehalt hin untersucht. Der Gehalt an N_2 konnte aber trotz genauester mikroanalytischer Bestimmungsversuche nur schätzungsweise zu etwa 0,2 Proz. festgestellt werden.

Dagegen zeigte die organische Substanz, sofern sie aus einem Extrakt gewonnen war, den wir durch *zweitägiges* Einwirkenlassen von verdünntem Ammoniak[1]) auf Pergamentpapier erhielten, einen Gehalt an 2,028 Proz. N_2.

Durch *sechstägige* Extraktion mit Ammoniak und nachfolgendes Eindampfen des Extrakts resultierte eine Substanz, deren Stickstoffgehalt 5,3 Proz. betrug.

Um die zweifellos bestehende *Reduktionswirkung* des Pergamentpapierextrakts — ein aus je 100 qcm Papier durch 5 Minuten währendes Kochen mit H_2O oder dreitägiges Extrahieren bei Zimmertemperatur gewonnener Extrakt war ohne weiteres imstande, ammoniakalische Silbernitratlösung in der Hitze zu rotbraunem kolloiden Silber und Gold (III)-chlorid zu blauem kolloiden Gold zu reduzieren — nunmehr quantitativ verfolgen zu können, setzten wir verschiedene Versuchsreihen an und verfuhren dabei folgendermaßen:

Je 100 qcm Pergamentpapier wurden in kleine Streifen zerschnitten und in einer ersten Versuchsreihe mit 40 ccm destillierten Wassers, in einer zweiten — um wiederum die Dialyse ammoniakhaltiger Lösungen nachzuahmen — mit 40 ccm n/10 NH_3 überschichtet. Diese

[1]) NH_3 wurde verwendet in Anlehnung an die ursprünglich ausgeführte Dialyse ammoniakalischer Silbersalzlösungen.

Extraktion wurde in der Versuchs- und der an einem anderen Stück Pergamentpapier angesetzten Kontrollreihe in gut verschlossenen Kolben durch ruhiges Stehenlassen bei Zimmertemperatur ausgeführt. Nach bestimmten Zeitabschnitten wurde dann der Extrakt von den Papierschnitzeln abgegossen, das zurückbleibende Papier dreimal mit je 10 ccm destillierten Wassers abgespült, Extrakt und Waschwasser vereinigt und in der so erhaltenen Gesamtflüssigkeit nach der *Bang*-schen Mikromethode[1]) der Reduktionswert bestimmt. Zum Vergleich wurde eine Standardlösung von Traubenzucker nach der gleichen Methode titriert und ergab für 1 mg Zucker einen Verbrauch von 2,25 ccm n/100 Jodatlösung. Rechnet man die für die verschiedenen Extrakte jeweils zur Titration verbrauchten Mengen Jodat entsprechend um, so erhält man die in Tabellen I bis IV, Spalte 5 aufgeführten Vergleichswerte.

Tabelle I (Kurve 1).

Wässeriger Extrakt. Vorgelegt: 2,5 ccm n/100 Jodat.

Versuch	Dauer der Extraktion Tage	Zur Rücktitration verbrauchte n/100 $Na_2S_2O_3$ ccm	Verbrauch an n/100 Jodat ccm	Entsprechen Zucker mg
1	1	2,18	0,32	0,142
2	2	1,77	0,73	0,324
3	3	1,46	1,04	0,462
4	5	1,21	1,29	0,573
5	7	1,01	1,49	0,662
6	9	0,96	1,54	0,684
7	24	0,56	1,94	0,862
8	32	0,37	2,13	0,946
9	42	0,08	2,42	1,075

Tabelle II (Kurve 2).

Ammoniakalischer Extrakt. Vorgelegt: 2,5 ccm n/100 Jodat.

Versuch	Dauer der Extraktion Tage	Zur Rücktitration verbrauchte n/100 $Na_2S_2O_3$ ccm	Verbrauch an n/100 Jodat ccm	Entsprechen Zucker mg
1	1	1,71	0,79	0,351
2	2	1,47	1,03	0,457
3	3	1,30	1,20	0,533
4	5	1,02	1,48	0,657
5	7	0,92	1,58	0,702
6	9	0,92	1,58	0,702
7	11	1,11	1,39	0,617
8	23	1,61	0,89	0,395
9	30	2,08	0,42	0,186

[1]) Mikromethoden der Blutuntersuchung. München 1920.

Tabelle III (Kontrollversuch) (Kurve 3).
Wässeriger Extrakt. Vorgelegt bei Versuch 1 bis 8: 2,5 ccm n/100 Jodat, bei Versuch 9: 3,0 ccm n/100 Jodat.

Versuch	Dauer der Extraktion Tage	Zur Rücktitration verbraucht n/100 $Na_2S_2O_3$ ccm	Verbrauch an n/100 Jodat ccm	Entsprechen Zucker mg
1	2	1,76	0,74	0,328
2	4	1,20	1,30	0,577
3	6	1,05	1,45	0,644
4	8	1,01	1,49	0,662
5	10	0,99	1,51	0,671
6	12	0,96	1,54	0,684
7	23	0,84	1,66	0,737
8	35	0,69	1,81	0,804
9	46	0,50	2,50	1,110

Tabelle IV (Kontrollversuch) (Kurve 4).
Ammoniakalischer Extrakt. Vorgelegt: 2,5 ccm n/100 Jodat.

Versuch	Dauer der Extraktion Tage	Zur Rücktitration verbraucht n/100 $Na_2S_2O_3$ ccm	Verbrauch an n/100 Jodat ccm	Entsprechen Zucker mg
1	2	1,46	1,04	0,462
2	4	1,01	1,49	0,662
3	6	0,96	1,54	0,684
4	8	0,91	1,59	0,706
5	10	0,96	1,54	0,684
6	12	1,04	1,46	0,648
7	23	1,70	0,80	0,355
8	34	2,09	0,41	0,182

Die Berechtigung zu der Annahme, daß es sich bei der reduzierend wirkenden Substanz des Pergamentpapiers um zuckerartige Stoffe handelt, gibt uns folgender Versuch:

2 ccm eines Extrakts, der aus 20 qdm Pergamentpapier durch einstündiges Kochen mit 200 ccm H_2O erhalten worden war, gab eine positive *α-Naphtholreaktion* nach *Molisch*[1]). Die Art der vorliegenden Zucker konnte jedoch infolge der geringen Mengen, die der gesamte Extrakt enthielt (durch die Mikromethode von *Bang* ermittelt), nicht festgestellt werden. Sie ließen weder eine Drehung des polarisierten Lichts erkennen, noch war es möglich, sie mit Hilfe von Phenylhydrazin zu identifizieren.

Aus den Tabellen I und II und den Kurven 1 und 2, die die Reduktionswerte sowohl für die wässerige als auch für die ammoniakalische Ex-

[1]) Ber. 19, R. 746, 1886; *Abderhalden* Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. I, Tl. 5, S. 49.

traktion wiedergeben sollen, und aus den Kurven und Tabellen III und IV, die die Kontrollversuche darstellen, ist ersichtlich, daß eine mit der Zeit stetig zunehmende Reduktionswirkung des wässerigen Extrakts zu beobachten ist. Auffallend ist, daß die ammoniakalischen Extrakte (Kurven 2 und 4) den Höchstwert für die Reduktionskraft am achten Tage erreicht haben, und daß diese dann ziemlich schnell und stetig abnimmt. Man könnte annehmen, daß Ammoniak mit den

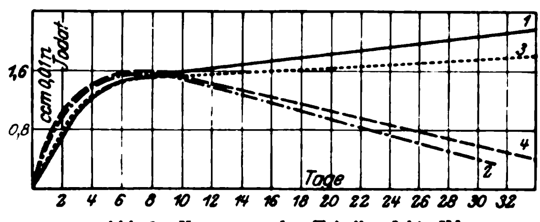


Abb. 1. Kurven zu den Tabellen I bis IV.

aus dem Pergamentpapier stammenden Stoffen reagiert[1]), und daß dabei die reduzierenden Eigenschaften der Extrakte verloren gehen. Daß Ammoniak nicht ohne Einfluß auf Pergamentpapier ist, erhellt aus den oben angeführten Ergebnissen der Stickstoffbestimmungen im ammoniakalischen Extrakt, der trotz langen, zur Entfernung des überschüssigen Ammoniak ausgeführten Kochens deutlich bestimmbare Mengen Stickstoff enthielt.

Die Zahlenwerte in den Tabellen I und III lassen erkennen, daß in 4 Tagen bei nachgeahmter ruhiger Dialyse — ein Zeitraum, der sehr häufig zur vollständigen Dialyse beansprucht wird — bereits aus einer verhältnismäßig kleinen Pergamentpapierfläche (1 qdm) die extrahierte Menge an reduzierender Substanz — unter der Annahme, daß es sich um Glucose handelt — bereits 0,5 mg überschreitet und in 42 Tagen mehr als 1 mg beträgt. Bedenkt man aber, daß im allgemeinen bei der Dialyse eine wesentlich größere Fläche Pergamentpapier zur Verfügung steht[2]), so wird man ohne weiteres erkennen, daß bei der Verwendung von Solen, die leicht reduzierbare Stoffe enthalten, die Möglichkeit besteht, daß im Laufe der Dialyse Veränderungen in den Eigenschaften der kolloiden Systeme durch die von der Membran abgegebenen reduzierenden Bestandteile hervorgerufen werden. Wie unsere eigenen Versuche an organischen Silberpräparaten ergaben, erscheint in solchen

[1]) Daß Ammoniak in höheren Konzentrationen auf Glucose einwirken kann, ist aus den Arbeiten von *A. Windaus* und *F. Knoop* bekannt (Ber. **38**, 1166, 1905; **39**, 3886 1906; **40**, 799, 1907).

[2]) Die Pergamentpapierfläche eines Schnelldialysators nach *A. Gutbier*, *I. Huber* und *W. Schieber*, Ber. **55**, 1518, 1922 mit einem Fassungsvermögen von 1000 ccm beträgt z. B. rund 20 qdm.

Fällen eine ausgiebige vorangehende Wässerung des zur Dialyse zu verwendenden Pergamentpapiers dringend geboten.

Daß die aus dem Pergamentpapier stammenden Substanzen neben der reduzierenden auch Schutzwirkung auszuüben imstande sind (vgl. *R. Zsigmondy*, l. c.), kann gut mit der Annahme, daß es sich um Zucker handelt, in Einklang gebracht werden, denn es ist bekannt, daß z. B. Traubenzucker mit seiner Reduktionskraft die Fähigkeit vereinigt, kolloide Systeme ganz wesentlich zu stabilisieren [vgl. Kolloides Selen und Tellur[1])].

---

[1]) *A. Gutbier*, Kolloid-Zeitschr. **28**, 334, 1923; *A. Gutbier* und *B. Ottenstein*, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **149**, 223, 1925.

Beiträge zur physiologischen und pathologischen Chemie des Gehirns.

I. Mitteilung:

Über die Stickstoffverteilung in der Petrolätherfraktion des Pferdehirns.

Von

Karl Singer.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener Physiologischen Universitätsinstitut.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der Seegenstiftung der Akademie der Wissenschaften in Wien.)

(Eingegangen am 23. Oktober 1926.)

I. Einleitung.

Fast alle größeren Abhandlungen über Hirnchemie pflegen die besonders großen Schwierigkeiten dieses Forschungsgebietes zu betonen und auf diese Weise das Mißverhältnis zu erklären, welches zwischen der darauf verwendeten Arbeit und Mühe und den tatsächlich erzielten Erkenntnissen besteht. Fragt man nun nach diesen besonderen Schwierigkeiten, so lassen sich diese wohl in den folgenden drei Punkten zusammenfassen:

1. Die Hauptmasse des Gehirns, nach *Siegmund Fränkel*[1]) zwei Drittel der Gesamttrockensubstanz, besteht aus „Lipoiden“, also aus Stoffen verschiedenster chemischer Struktur, die aber alle durch eine außerordentlich große Ähnlichkeit ihrer Löslichkeitsverhältnisse ausgezeichnet sind, so daß eine exakte Trennung schwer durchzuführen ist.

2. Diese Stoffe unterliegen vielfach schon Veränderungen durch das Tageslicht, ferner werden sie oft durch ganz geringe Konzentrationen von Säuren oder Basen zerstört.

3. Die Anwesenheit irgend eines Lipoids in einem Lösungsmittel verändert die Löslichkeitsverhältnisse eines anderen Lipoids in diesem

[1]) *Siegmund Fränkel*, Ergebn. d. Physiol. 8, 212, 1909.

Lösungsmittel in weitgehendem Maße. So ist z. B. das Cephalin in reinem Äthylalkohol fast völlig unlöslich; enthält aber der Alkohol Lecithin, so wird das Cephalin in nicht unbeträchtlichen Mengen darin gelöst.

S. Fränkel[1]) hat nun ein Verfahren angegeben, welches es ermöglicht, die einzelnen Stoffe der Hirnmaterie doch getrennt voneinander zu erhalten, und diesem Verfahren haben sich auch die meisten auf diesem Gebiet arbeitenden Forscher angeschlossen. Nach genügender Vorbehandlung und Entwässerung wird das Gehirn mit Aceton extrahiert. In diese Fraktion gehen das Cholesterin und das Leucopoliin[2]) über. Dann werden mit Petroläther die ungesättigten Phosphatide (das Lecithin und das Cephalin) und auch einige gesättigte Phosphatide gewonnen. Durch Behandlung mit Alkohol kann man in der Petrolätherfraktion das Cephalin ausfällen. Doch zeigt diese Methodik der Gewinnung des Cephalins, wie *Fränkel* selbst betont, große Schwierigkeiten, da sehr rasch gearbeitet und die zu bestimmende Substanz weiter gereinigt werden muß, und dann auch wohl wegen der eingangs unter 3. besprochenen Verhältnisse, so daß die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse wohl nur annähernd quantitative sind.

Nach der Behandlung mit Petroläther lassen sich dann noch mit heißem Alkohol die übrigen gesättigten Phosphatide und Cerebroside (die matière blanche) aus dem Gehirn darstellen.

Untersuchungen, welche es sich zum Ziel setzten, die chemischen Veränderungen zu erforschen, die durch Gehirnkrankheiten, vor allem durch die *progressive Paralyse*, am Menschenhirn gesetzt werden, machten es nötig, sich nach Methoden umzusehen, die ein wirklich quantitatives Arbeiten ermöglichen.

Es ist schon seit langem bekannt, daß bei progressiver Paralyse eine Verringerung des Lipoidphosphors besteht, und *Pighini* und *Carbone*[3]) konnten unter anderem zeigen, daß wahrscheinlich die ungesättigten Phosphatide dabei eine mehr oder minder große Verringerung erfahren. Bei den Untersuchungen, über welche hier berichtet werden soll, wurde daher zunächst ausschließlich die Petrolätherfraktion berücksichtigt. Um den schon erwähnten Schwierigkeiten bei der Erfassung der einzelnen Substanzen auszuweichen, wurde die *Stickstoffverteilung* in der Petrolätherfraktion zum Einteilungsprinzip genommen. Das Cephalin gibt bei der Spaltung eine Aminostickstoffbase, das Colamin (Aminoäthylalkohol) ab, das Lecithin das Cholin (Trimethyl-

---

[1]) *Siegm. Fränkel,* Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. I, Teil 6, S. 1.

[2]) *Siegm. Fränkel* und *Herbert Elias,* diese Zeitschr. **28**, 320, 1910.

[3]) *Pighini* und *Carbone,* diese Zeitschr. **46**, 450, 1912.

oxäthylammoniumhydroxyd). Durch Bestimmung der Basen ohne vorhergehende Trennung der einzelnen Bestandteile durch Alkohol mußte es gelingen, unter Vermeidung erheblicher Fehlerquellen zu einer verläßlichen Übersicht über die Mengenverteilung der einzelnen Bestandteile zu gelangen. Zwar entbehrt diese Einteilung des Vorteils der Spezifität, da sehr leicht denkbar ist, daß noch andere im Extrakt enthaltene, noch nicht näher bekannte Stoffe bei der angewendeten Methodik mitbestimmt werden könnten. Doch tritt dieser Nachteil für die Fragestellung, ob überhaupt quantitative Veränderungen bei progressiver Paralyse nachweisbar sind, in den Hintergrund gegenüber dem Vorteil des fehlerfreien Arbeitens.

Außer dem Gesamtaminostickstoff und dem Cholin wurde auch versucht, den Stickstoffbestandteil der in der Petrolätherfraktion enthaltenen Cerebroside (Galaktoside), das Sphingosin, zu erfassen. Und zwar derart, daß die Galaktose, welche mit dem Sphingosin zusammen in den Cerebrosiden enthalten ist, bestimmt, und daraus der Sphingosinstickstoff errechnet wurde. Auch hier gilt dasselbe bezüglich der Spezifität, was vorhin darüber gesagt wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst die Methodik und die mit ihr erzielten Ergebnisse beim Pferdehirn, welches der leichteren Handhabung wegen vorerst verwendet wurde, besprochen werden. Über die Verhältnisse beim normalen und progressiv paralytischen Menschenhirn wird in der nächsten Mitteilung berichtet werden.

II. Methodik zur Bestimmung des Amino- und Cholinstickstoffs der Petrolätherfraktion des Pferdehirns.

Das Gehirn wurde bei seiner Übernahme von Blut und Meningen gereinigt, dann gewogen und hierauf mit der Fleischhackmaschine zu einem feinen Brei zerkleinert. Dieser wurde dann mit kaltem Aceton. pur. versetzt, um das Gehirn zu entwässern; nach 24 Stunden wurde koliert und der Prozeß nochmals wiederholt. Am dritten Tage wurde dann der Gehirnbrei mit heißem Aceton im Soxhlet extrahiert. Zur Gewinnung der Petrolätherfraktion wurde zunächst der Orientierung halber, entgegen der Vorschrift von *Fränkel*, der gewöhnliche käufliche Petroläther verwendet, (*Fränkel* benutzt nur die bis 55° überdestillierenden Anteile des Petroläthers) und das Gehirn damit im Soxhletapparat so lange extrahiert, bis keine gelbliche Verfärbung des Petroläthers mehr bemerkbar war. Nun wurde der Petroläther abdestilliert und die vorher gelblich-trübe Flüssigkeit, *bei der sich schneeweiße Massen beim längeren Stehen absetzten*, nahm nach der Destillation eine klare, braunrote Farbe an. Die Flüssigkeit wurde dann in einer Kristallisierschale noch so lange am Wasserbad erhitzt, bis keine Blasen vom abdampfenden Petroläther mehr aufstiegen. Diese Flüssigkeit (*Petrolätherfraktionslösung*), welche wohl eine kolloidale Suspension der Phosphatide darstellt, und die einen kaum mehr merklichen Geruch nach Petroläther zeigte, wurde nun für die anzustellenden Untersuchungen verwendet. Von einem Pferdehirn bekommt man derart etwa 150 bis 250 ccm. Dampft

man die Flüssigkeit am Wasserbad vollständig ab, so erhält man eine zähe, klebrige, gelbbraune Masse, die sich für das Einwägen und Arbeiten nur sehr schlecht eignet. Durch das Verwenden der pipettierbaren Flüssigkeit kann man jedoch mittels aliquoter Teile wirklich völlig quantitativ arbeiten.

Zunächst wurde das Trockengewicht der erhaltenen Lösung bestimmt, indem 10 ccm in eine kleine Kristallisierschale pipettiert, am Wasserbad zur Trockne eingedampft und dann noch bis zur Gewichtskonstanz im Vakuumexsikkator getrocknet wurden.

Der Gesamtstickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt: 2 ccm der Lösung enthielten 3 bis 6 mg Stickstoff.

A. Cholin.

Zur Bestimmung des *Cholins*, der Stickstoffbase des Lecithins, wurde die Methode von *V. Staněk*[1]) herangezogen. Dieser Autor konnte zeigen, daß Cholin und auch Betain durch eine hochkonzentrierte J-JK-Lösung als Cholin- (bzw. Betain-) enneajodid $C_5H_{14}NOJ . J_8$, nach 6 Stunden in Form grüner Kriställchen gefällt werden. Dabei wird das Cholin in *saurer* und *alkalischer* Lösung völlig niedergeschlagen, Betain nur in saurer Lösung, und er konnte so auch in Gemischen von Cholin und Betain beide fast zur Gänze getrennt voneinander erhalten. Von der erhaltenen Cholin- (bzw. Betain-) Jodverbindung bestimmte er den Stickstoff nach *Kjeldahl*. 1 ccm n/10 Schwefelsäure entspricht 12,119 mg Cholin. Als Jodlösung verwendete er 153 g Jod plus 100 g Jodkali auf 200 ccm Aqua dest.

Bei der Anwendung dieser Methode auf Gehirnextrakt konnte gezeigt werden, daß zur völligen Fällung des Cholins auch *geringere* Konzentrationen der Jod-Jodkalilösung genügen, was die Möglichkeit zu nicht unbeträchtlichen Ersparnissen bedeutet. Die verwendete Lösung hatte bei den angestellten Versuchen eine Konzentration von 45 g Jod plus 40 g Jodkali auf 100 ccm Aqua dest.

Um das Cholin zu erhalten, war es notwendig, eine Hydrolyse des Lecithins durchzuführen. Dabei war darauf zu achten, daß das Cholin, welches gegen Säuren und Basen stärkerer Konzentration sehr empfindlich ist, nicht zerstört werde. *Malengreau* und *Prigent*[2]) gelang es, durch Kochen von Lecithincadmiumchlorid mit dem 50fachen Volumen n/10 Salz- oder Schwefelsäure nach 8 bis 13 Stunden das Cholin *völlig und unzerstört* abzuspalten. Dies wurde nun auf die Petrolätherfraktion des Gehirns angewandt.

Zunächst wurde:

a) mit eingewogenen Cholinmengen in der *Kälte* die Methode von *Staněk* nachgeprüft.

---

[1]) *Vladimir Staněk*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 280; **47**, 83.
[2]) *Malengreau* und *Prigent*, H. **77**, 107.

Dabei wurde in saurer Lösung gearbeitet (das Cholin wurde in n/10 Schwefelsäure gelöst).

b) Hierauf wurde eingewogenes *Cholin* mit 150 ccm n/10 Schwefelsäure 15 bis 18 Stunden *am Rückflußkühler erhitzt*, um festzustellen, ob dabei eine Zerstörung des Cholins eintritt.

c) Dann wurden 4 bis 6 ccm der *Petrolätherfraktionslösung* mit 100 bis 150 ccm n/10 Schwefelsäure ebenfalls 15 bis 18 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Es scheiden sich die Fettsäuren an der Oberfläche der Flüssigkeit ab, während die Basen in Lösung gehen und die Schwefelsäure gelb gefärbt wird. Es erwies sich als zweckmäßig, die Flüssigkeitsmenge von 150 ccm in Kolben von 750 bis 1000 ccm Inhalt zu erhitzen, da man sonst eine breiartige Emulsion der Fettsäuren in der Flüssigkeit bekommt, welche der nun folgenden Filtration sehr große Schwierigkeiten bereitet, so daß dadurch große Verluste entstehen. Wurde mit einer einmaligen Filtration durch Faltenfilter das Filtrat nicht klar erhalten, so wurde die Filtration wiederholt, bis die Lösung nicht mehr trüb war. Nachdem die auf dem Filter befindlichen Fettsäuren mit destilliertem Wasser gut nachgewaschen worden waren, wurde das Filtrat auf das ursprüngliche Volumen eingeengt und dann mit der Jod-Jodkalilösung gefällt. Nach 6 bis 10 Stunden wurde durch ein *gehärtetes* Filter filtriert, die grünen Kriställchen der Cholin-Jodverbindung quantitativ auf das Filter gebracht und das überschüssige Jod durch Nachwaschen mit destilliertem Wasser möglichst entfernt. Das Filter wurde nun in einen Kjeldahlkolben gebracht und dort verascht.

d) Außer den bisher besprochenen Versuchen wurden noch Zusatzversuche angestellt, derart, daß eingewogene *Cholinmengen zur Petrolätherfraktionslösung hinzugegeben wurden*. Die Tabelle I orientiert über

Tabelle I.

Versuch		Zu bestimmende Menge	Zeit des Kochens am Rückflußkühler	Menge des J-Reagens	Sollwert n/10 H_2SO_4	Gef. Wert n/10 H_2SO_4	Gefundener Cholinwert	
		mg	Stunden	ccm	ccm	ccm	mg	Proz.
a	1	99	—	10	8,1	7,8	94,52	97
a	2	120,4	—	10	9,9	9,5	115,13	96
b	3	89,2	15	8	7,3	7,2	87,30	99
b	4	239,3	15	10	19,7	18,7	226,63	95
c	5	4 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	16	8	—	1,2	14,54	—
c	6	4 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	17	5	—	1,2	14,54	—
c	7	6 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	16	8	—	1,8	20,69	—
c	8	6 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	15	8	—	1,7	20,57	—
d	9	4 ccm + 58 mg	15	8	1,2 + 4,8 = 6,0	1,2 + 4,5 = 5,7	69,08	95
d	10	4 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösung + 80½ mg	15	11	1,2 + 6,6 = 7,8	1,2 + 6,2 = 7,4	89,68	95

die Versuchsergebnisse. Die Petrolätherfraktionslösung stammte vom Pferdehirn Nr. 1.

Wie aus der Tabelle I hervorgeht, gelingt es also in der oben angegebenen Weise, den Cholinstickstoff der Petrolätherfraktion fast völlig quantitativ zu erfassen, und die vorhandenen Fehler bei der Bestimmung des Cholins verschwinden völlig bei der Umrechnung auf den Gesamtstickstoff der Petrolätherfraktion zur Ermittlung des prozentualen Anteils. Bei den Versuchen d) (9 bis 10) ist durch Zerlegung in Teilfaktoren die Art der Ermittlung der gefundenen Prozente ersichtlich gemacht.

B. Aminostickstoff.

Bei der Bestimmung des *Aminostickstoffs* (wohl vorwiegend des *Colamins*, der Stickstoffbase des *Cephalins*) wurde in folgender Weise vorgegangen: Das Colamin (Aminoäthylalkohol) enthält eine endständige Aminogruppe. *Baumann*[1]) im Laboratorium *Hofmeister* hat als erster den *van Slyke*-Apparat zur Bestimmung endständiger Aminogruppen zur Erfassung des Colamins herangezogen. Er bestimmte in rein dargestelltem Cephalin aus Menschenhirn die endständige Aminogruppe.

Ähnlich wie beim Lecithin wurde in den vorliegenden Versuchen zunächst eine Hydrolyse mit *normaler* Schwefelsäure durchgeführt, da das Colamin gegen Säuren widerstandsfähiger ist als das Cholin. Nach der Hydrolyse wurde wie bei den anderen Versuchen filtriert, nachgewaschen, eingedampft, dann die Lösung mit starker Natronlauge neutralisiert und hierauf im *van Slyke*-Apparat zur Bestimmung endständiger Aminogruppen in der *Modifikation von E. Kupelwieser* und *K. Singer*[2]) untersucht. Diese Modifikation ermöglicht es nämlich, größere Mengen als im Makro-*van Slyke*-Apparat (bis zu 20 ccm) mit der Genauigkeit des Mikroapparats, d. i. bis auf hundertstel Milligramm, zu bestimmen. Bei den Versuchen wurden immer zwei- bis dreimal 15 ccm der neutralisierten Aminobasenlösung im Apparat untersucht und aus dem derart gefundenen Mittelwert der Aminostickstoffgehalt der Gesamtflüssigkeitsmenge errechnet.

In der Tabelle II sind die mit dem Colamin durchgeführten Versuche ersichtlich gemacht. Das Colamin wurde als Colaminchlorhydrat (*La Roche*, Basel) eingewogen. Die Petrolätherfraktionslösung stammte ebenfalls vom Pferdehirn Nr. 1.

Die Art der angestellten Versuche war dieselbe wie beim Cholin.

---

[1]) *Baumann*, diese Zeitschr. 54, 30, 1913.

[2]) *Ernst Kupelwieser* und *Karl Singer*, ebendaselbst, im Erscheinen begriffen.

Tabelle II.

Versuch		Zu bestimmende Menge Colaminchlorhydrat mg	Zeit des Kochens am Rückflußkühler Stdn.	Gesamte Flüssigkeitsmenge ccm	Temperatur °C	Druck mm	Wert für die Gesamtflüssigkeit ccm N-Gas	Gesamtwert Aminostickstoff Soll mg	Gesamtwert Aminostickstoff Gefunden mg	Gesamtwert Aminostickstoff Gefund. Proz.
a	1	40,75	—	50	21	743	10,200	5,851	5,664	96,75
a	2	57,80	—	50	20	750	14,500	8,299	8,142	98,20
b	3	40,75	14	180	21	743	10,320	5,851	5,710	97,50
b	4	57,80	16	215	20	750	14,480	8,299	8,130	98,20
c	5	2 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	14	180	20	753	3,000	—	1,691	—
c	6	2 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	14	188	19	747	3,120	—	1,752	—
c	7	4 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	14	180	20	753	6,000	—	3,582	—
c	8	4 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösg.	14	180	20	753	6,000	—	3,582	—
d	9	2 ccm + 29,6 mg	16	180	19	747	10,200	5,970	1,720 + 3,999 = 5,720	96,00
d	10	2 ccm P.-Ä.-Fr.-Lösung + 25,3 mg	17	195	20	745	9,490	5,332	1,721 + 3,519 = 5,240	99,50

Auch die Tabelle II läßt wohl die quantitative Erfassung der endständigen Aminogruppen in der Petrolätherfraktionslösung erkennen.

Die hier dargelegte Methodik dürfte aber nicht nur bei Verarbeitung des ganzen Gehirns anwendbar sein, sondern auch bei Untersuchungen einzelner kleinerer Gehirnpartien, wie dies in letzter Zeit von *Helene Gorodissky*[1]) unternommen worden ist. Bei der *Stanĕk*schen Bestimmung wäre vielleicht statt des Makroapparats der Mikrokjeldahlapparat zu verwenden oder die *Sharpesche Modifikation*[2]) der *Stanĕk*schen Methode. Der modifizierte *van Slyke*-Apparat reicht zur Bestimmung größerer wie auch kleinerer Mengen vollkommen aus.

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß von allen unternommenen Versuchen *Doppelbestimmungen* gemacht wurden.

III. Orientierungsversuche mittels Extraktion mit dem gewöhnlichen käuflichen Petroläther.

Zunächst wurden zur Orientierung drei Pferdehirne nach genügender Vorbehandlung mit dem nicht raffinierten käuflichen Petroläther extrahiert und der Extrakt in der vorhin dargelegten Weise untersucht. In Tabelle III sind die gefundenen Werte ersichtlich gemacht.

---

[1]) *Helene Gorodissky*, diese Zeitschr. **159**, 379; **164**, 446, 1925.
[2]) *J. S. Sharpe*, Biochem. Journ. **27**, 42, 1923.

Tabelle III.

Nr. des Gehirns	Natives Gewicht g	Trockengewicht der Petrolätherfraktion g	N in Proz. der Trockensubstanz	Stickstoffverteilung Cholin-N	Amino-N	Rest-N	Relation Amino-N : Cholin-N
				in Proz. des Gesamtstickstoffs			
1	480	26,6	1,5	15,5	31,5	53,0	2 : 1
2	500	27,8	1,6	13,0	25,0	62,0	2 : 1
3	500	28,4	1,5	17,0	26,0	58,0	1,5 : 1

Wie aus der Tabelle III hervorgeht, ist der Wert des Cholinstickstoffs immer kleiner als der des Aminostickstoffs. Die Größenordnung ist aber immer dieselbe und die Unterschiede sind wohl als individuelle Differenzen aufzufassen. Dieses Überwiegen des Aminostickstoffs über den Cholinstickstoff war auch — dies sei schon hier vorweggenommen —, in mehr oder weniger ausgeprägter Weise bei allen untersuchten Pferdehirnen der Fall. Cholinstickstoff plus Aminostickstoff machen aber *bei diesem Extraktionsverfahren* kaum die Hälfte des Gesamtstickstoffs aus. Der andere Stickstoff (Reststickstoff) ist wohl wahrscheinlich zum größten Teil den *gesättigten Phosphatiden* zuzuordnen, die ja nach *Siegm. Fränkel* auch teilweise in die Petrolätherfraktion übergehen. Durchgeführte Phosphorbestimmungen ergaben eine Phosphorstickstoffrelation von 1,995 : 1, also einen nicht unbeträchtlichen Phosphorüberschuß [der Phosphor wurde nach *Neumann-Gregersen*[1])] bestimmt.

Cephalin und Lecithin sind Monophosphatide, daher ist ihre Phosphorstickstoffrelation 1 : 1.

Die hier angegebene unspezifische Methode erlaubt es also, einen Überblick über den Anteil der ungesättigten und gesättigten Bestandteile zu gewinnen.

IV. Versuche zur Ermittlung des Cerebrosidstickstoffs in der Petrolätherfraktion.

H. Loening und *H. Thierfelder*[2]) konnten bei ihren Cerebrosidstudien eine ziemlich bedeutende Menge von Cerebrosiden im Ätherextrakt nachweisen, und *E. Klenk*[3]) im Laboratorium von *Thierfelder* ist es gelungen, daraus das „*Nervon*“ darzustellen, das aus einer ungesättigten Fettsäure, der „*Nervonsäure*“, aus Galaktose und aus Sphingosin, einem zweiwertigen, ungesättigten Monoaminoalkohol besteht.

[1]) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. I, Teil 3, S. 825.
[2]) *H. Loening* und *H. Thierfelder*, H. 77, 202.
[3]) *E. Klenk*, H. 145, 244, 1925.

Bei den vorangegangenen Versuchen zur Ermittlung des Aminostickstoffs wurde also wahrscheinlich auch der Sphingosinstickstoff mitbestimmt und es wurde nun versucht, diesen Stickstoffgehalt der Galaktoside derart zu bestimmen, daß die *Galaktose* ermittelt und dann auf den Gesamtstickstoff umgerechnet wurde. Zur Bestimmung der Galaktose diente die von *H. Thierfelder* bei seinen Cerebrosidstudien angewandte Methode[1]), die auf die Petrolätherfraktionslösung übertragen wurde. *Thierfelder* hat Phrenosin mit Methylalkohol und Schwefelsäure 8 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Dabei wird das Cerebrosid gespalten und die Galaktose in Methylgalaktosid übergeführt. Nach Entfernung des Methylalkohols und genügender Filtration konnte er dann im Filtrat die Galaktose nach *Bertrand* bestimmen.

Bei den Untersuchungen, die an den Gehirnen Nr. 4 bis 6 angestellt wurden, wurden zunächst, nachdem die Stickstoffverteilung in derselben Weise wie bei den ersten Versuchen ermittelt worden war, 50 ccm der Petrolätherfraktionslösung mit 45 ccm Methylalkohol und 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure 8 bis 10 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Daraufhin wurden in die trübe Lösung 100 ccm destillierten Wassers gegossen und zwei- bis dreimal filtriert. Die Flüssigkeit wurde dadurch etwas klarer; dann wurde der Methylalkohol abgedampft, etwas eingeengt, neutralisiert und dann so lange filtriert, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nachdem auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt worden war, wurden in 20 ccm der Zuckergehalt nach *Bertrand* bestimmt.

In Tabelle IV sind die Ergebnisse der drei untersuchten Gehirne mitgeteilt. Nr. 6 wurde nach den *Fränkel*schen Angaben mit dem gereinigten Petroläther untersucht, d. h. es wurden nur die bis 55° überdestillierenden Fraktionen zur Destillation verwendet.

Tabelle IV.

Nr. des Gehirns	Natives Gewicht	Trockengewicht der Petrolätherfraktion	N in Proz. der Trockensubstanz	Stickstoffverteilung				Relation Amino-N : Cholin-N
				Cholin-N	Amino-N	Rest-N	Galaktosid-N	
	g	g		in Proz. des Gesamtstickstoffs				
4	440	25,8	1,5	17	24	59	5	1,4 : 1
5	435	29,9	1,8	19,5	27	53,5	5	1,4 : 1
6	500	36,8	1,7	24	28	48	2—3	1,2 : 1

Wie die Tabelle IV zeigt, sind bei diesen drei Gehirnen die Cholinanteile etwas größer als bei den vorher untersuchten; bei dem Gehirn Nr. 6 ist die Cholinprozentzahl fast so groß wie der Aminostickstoffanteil. Bei diesem Gehirn, das mit dem gereinigten Petroläther extra-

[1]) *H. Thierfelder*, H. 85, 35.

hiert wurde, ist der Reststickstoff um ein Geringes vermindert, doch läßt sich dies aus der Verschiebung des Cholinstickstoffs zu höheren Werten erklären, so daß eine wesentliche Verringerung der Aufnahme der den Reststickstoff enthaltenden Substanzen bei Benutzung des raffinierten Petroläthers an diesem Gehirn nicht feststellbar war. Der Galaktosidstickstoffgehalt der Petrolätherfraktionslösung ist in der Tabelle ersichtlich gemacht; bei Gehirn Nr. 6 waren die Galaktoside wohl qualitativ nach *Bertrand* nachweisbar, doch fielen sie bei der Bestimmung in die Fehlergrenze der Bertrandmethode (20 ccm der Lösung enthielten etwas weniger als 10 mg Galaktose), so daß nur eine Schätzung möglich war, da nicht genügend Petrolätherfraktionslösung zur Neuanstellung eines Versuchs mit größeren Mengen zur Verfügung stand.

V. Versuche nach Entfernung der „matière blanche".

Bei weiteren drei Gehirnen wurde nach der Extraktion mit Petroläther der weiße Niederschlag, der sich beim Stehenlassen absetzt, durch längeres und wiederholtes Zentrifugieren zu entfernen versucht und von dem so bearbeiteten Petrolätherextrakt dann der Petroläther möglichst abdestilliert und die Petrolätherfraktionslösung eingeengt. Gehirn Nr. 7 und 8 wurden mit dem raffinierten Petroläther, das Gehirn Nr. 9 mit dem gewöhnlichen käuflichen extrahiert. Alle drei Gehirne wurden nach dem Zentrifugieren auf ihre Stickstoffverteilung untersucht.

Tabelle V.

Nr. des Gehirns	Natives Gewicht g	Trockengewicht der Petrolätherfraktion g	N in Proz. der Trockensubstanz	Stickstoffverteilung				Relation Amino-N : Cholin-N
				Cholin-N	Amino-N	Rest-N	Galaktosid-N	
				in Proz. des Gesamtstickstoffs				
7	510	29,8	2,4	23	38	39	2,5	1,65 : 1
8	500	30,4	1,9	22	40	38	2,0	1,66 : 1
9	570	31,2	1,9	22	33	45	2,0	1,50 : 1

Wie die Tabelle V darlegt, gelingt es derart, den Reststickstoffgehalt etwas herabzusetzen, während die Aminostickstoff- und Cholinstickstoffprozentzahlen in mehr oder weniger deutlicher Weise in die Höhe gehen. Einen bedeutenden Unterschied zwischen dem Extraktionsverfahren mit raffiniertem und käuflichem Petroläther konnte auch diesmal nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassung.

Um feststellen zu können, ob am Menschenhirn durch Gehirnkrankheiten, vor allem durch die progressive Paralyse, chemische Veränderungen quantitativer Natur gesetzt werden, wurde versucht, zunächst an der Petrolätherfraktion des Pferdehirns, das der leichteren

Handhabung wegen vorerst verwendet wurde, eine Methodik auszuarbeiten, die ein genaues und fehlerfreies Arbeiten gestattet.

Als *Einteilungsprinzip* wurde die *Stickstoffverteilung in der Petrolätherfraktion* genommen. Es wurden bestimmt:

a) Das *Cholin*, die Stickstoffbase des Lecithins, nach einer etwas modifizierten Methode von *Vladimir Staněk*, nach vorhergehender Hydrolyse mit n/10 Schwefelsäure als Cholinenneajodid.

b) Der *Gesamtaminostickstoff*, wohl vorwiegend vom Colamin, der Stickstoffbase des Cephalins, herrührend, nach Hydrolyse mit normaler Schwefelsäure im modifizierten *van Slyke*-Apparat (*Kupelwieser* und *Singer*).

c) Der *Galaktosidstickstoff*, wohl vorwiegend vom Nervon (*E. Klenk*) stammend, durch Bestimmung der Galaktose nach *Bertrand*, nach vorheriger Hydrolyse mit schwefelsaurem Methylalkohol und Umrechnung auf den Gesamtstickstoff.

Es fand sich außerdem ein nicht unbeträchtlicher *Reststickstoff*. Es konnte mit dieser Methodik festgestellt werden, daß die *Aminostickstoff-Cholinstickstoffrelation für das Pferdehirn keine konstante* ist. Bei allen neun untersuchten Gehirnen war aber der *Aminostickstoff* in mehr oder minder ausgesprochener Weise *größer* als der Cholinstickstoff.

Die angegebene Methode gestattet ferner, sich über die *Menge* der bisher bekannt gewordenen ungesättigten Phosphatide und Cerebroside (Cephalin, Lecithin, Nervon) in der Petrolätherfraktionslösung ein Urteil zu bilden, und beweist durch das Vorhandensein eines *ziemlich bedeutenden Reststickstoffs*, daß noch eine recht beträchtliche Menge andersartiger Substanzen (wahrscheinlich gesättigte Phosphatide) in dieser Fraktion vorhanden sein dürften.

In der nächsten Mitteilung soll über die Ergebnisse beim normalen und krankhaft veränderten Menschenhirn berichtet werden.

Beiträge zur Biochemie des Asymmetrieproblems.
(Asymmetrische Dismutation.)

Von

Carl Neuberg und Ernst Simon.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Die Erzeugung asymmetrischer Substanzen mit optischer Aktivität, die in allen Aggregatzuständen bestehen bleibt und auf Derivate vererbbar ist, stellt eine der sinnfälligsten Fähigkeiten lebender Zellen dar. Deshalb verdient die Gewinnung von Verbindungen mit optischem Drehungsvermögen in vitro namentlich bei Fermentprozessen stets besondere Beachtung. Bis auf wenige Ausnahmen sind durch enzymatische Vorgänge nur *Spaltungen* verwirklicht, bei denen gemäß dem *Pasteur*schen Theorem der eine Antipode der angreifbaren Verbindung zerlegt, der andere aber nicht alteriert wird. Viel länger ist bekannt, daß man durch Verwendung lebender und wachsender Organismen die eine diastereomere Form zerstören und die zweite übrig behalten kann. Anders geartet sind, worauf wir mehrfach hingewiesen haben, die *Erscheinungen*[1]), *bei denen aus strukturell inaktiven Körpern*, ohne daß die Stufe der Racemverbindungen durchlaufen wird, *optisch aktive Gebilde hervorgehen.* Es ist dieses beispielsweise bei den *phytochemischen Reduktionen* der Fall; hier gibt sich der asymmetrische Verlauf der Hydrierung schon dadurch zu erkennen, daß die bei dieser Reaktion von synthetischem Charakter auftretenden Produkte zu mehr als 50 Proz. aus der optisch aktiven Komponente bestehen[2]).

Zu dieser Gruppe besonders beachtenswerter Vorgänge gehören ferner die Prozesse, die sich bei der *Dismutation* abspielen. Zunächst ist bei der Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure, die als eine

---

[1]) Vgl. die im Druck befindliche Mitteilung von *C. Neuberg* und *G. Gorr* über die „Phytochemischen Reduktionen" in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

[2]) Das nach *C. Neuberg*, *E. Färber* und *F. Nord* (diese Zeitschr. **112**, 313, 1920) aus Acetol phytochemisch gewonnene Propylenglykol z. B. enthält mindestens 80 Proz. der l-Komponente, wie sich auch aus den wichtigen Versuchen von *P. A. Levene* und *A. Walti* (Journ. of biol. Chem. **68**, 415, 1926) ergibt.

intramolekulare Dismutation betrachtet werden kann, von einem[1]) von uns früher die Beobachtung gemacht worden, daß mehr als 50 Proz., nämlich 70 Proz., an linksdrehender Milchsäure auftreten. Einen besonders eklatenten und wichtigen Fall hat jüngst *Paul Mayer*[2]) beschrieben. Er fand bei Untersuchungen im hiesigen Institut, daß aus Phenylglyoxal je nach Wahl des biologischen Agens zu 100 90 Proz. dextrogyre bzw. lävogyre Mandelsäure gebildet wird, die zugleich in optischer Beziehung praktisch 100proz. Reinheit aufwies. Dies ist der vollkommenste im Reagenzglas gelungene Versuch, willkürlich eine strukturell inaktive Substanz mit Hilfe biologischer Agenzien zu angenähert 100 Proz. in einen auch in optischer Hinsicht reinen asymmetrischen Abkömmling umzuformen. *P. Mayer* hat so aus Phenylglyoxal mit Milchsäurebakterien l(+)-Mandelsäure, mit Essigbakterien d(—)-Mandelsäure dargestellt.

Gleichfalls mit Essigbakterien, und zwar dem Bacterium ascendens, haben wir vor einiger Zeit[3]) eine *asymmetrische Dismutation des Methyläthyl-acetaldehyds* (d, l-Valeraldehyds) bewerkstelligt. Die Ausschläge in bezug auf das Drehungsvermögen der Umwandlungsprodukte „Amylalkohol" und „Valeriansäure" waren aber nur gering. Wir haben daher solche Versuche mit einem anderen Kleinlebewesen, mit dem *Bacterium pasteurianum*, von neuem aufgenommen, da sich dieser Erreger nach den Erfahrungen von *C. Neuberg* und *F. Windisch*[4]) als ein besonders geeigneter Katalysator der biochemischen Dismutation zu erkennen gegeben hat.

In sämtlichen Versuchen, die wir teils mit lebenden Mikroben, teils mit daraus hergestellten Acetonpräparaten ausgeführt haben, zeigte sich nun, daß die asymmetrische Dismutation des Methyl-äthylacetaldehyds regelmäßig gelingt. Es entstand dabei eine „Valeriansäure", die aktive Komponente einschloß. Namentlich aber haben wir den auftretenden „Amylalkohol" untersucht, da ja überhaupt die Bildung der Reduktionsphase das größere allgemeine Interesse beanspruchen darf.

In allen Fällen haben wir *rechtsdrehenden*, als l-Methyl-äthylcarbin-carbinol zu bezeichnenden Amylalkohol gewonnen. War es *P. Mayer* geglückt, mit Angehörigen zweier verschiedener Bakteriengruppen, mit Milchsäurebazillen einerseits und Essigbakterien andererseits, jeweils den einen möglichen optischen Antipoden der Mandelsäure aus Phenylglyoxal zu bereiten, so haben wir nunmehr den Nachweis erbracht, daß selbst *die zur gleichen Spezies der Essigbakterien*

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **51**, 484, 1913.
[2]) *P. Mayer*, ebendaselbst **174**, 420, 1926.
[3]) *C. Neuberg* und *E. Simon*, ebendaselbst **174**, 452, 1926.
[4]) *C. Neuberg* und *F. Windisch* ebendaselbst **166**, 454, 1925.

zählenden Vertreter sich hinsichtlich der stereochemischen Spezifität verschieden verhalten. Während uns mit racemischen Valeraldehyd früher das Bacterium ascendens lävogyren Amylalkohol und das gleichfalls zu den Essigbildnern zu rechnende Bacterium xylinum inaktiven Amylalkohol geliefert hatte, konstatierten wir für das Bacterium pasteurianum ausschließlich die Fähigkeit zur Bildung eines Überschusses von rechtsdrehendem Amylalkohol. Der Gehalt an dieser optisch aktiven Komponente betrug im Produkt der Dismutation bis 18 Proz.

Ein grundsätzlicher Unterschied im Verhalten lebender und mit Aceton abgetöteter Pasteurianum-Bakterien war nicht zu erkennen.

Wie ist nun überhaupt die Entstehung einer optisch aktiven Modifikation des Amylalkohols bei der Dismutation des racemischen Methyl-äthyl-acetaldehyds zu deuten? Im Gegensatz zu den von *Neuberg* und *Mayer* früher benutzten Substraten, dem Methylglyoxal und Phenylglyoxal, besitzt unser Ausgangsmaterial, der d, l-Valeraldehyd, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom; da eine Vernichtung des letzteren bei dem zarten Eingriff der Dismutation nicht in Betracht kommen kann, so muß der Reaktionsmechanismus ein verschiedener sein. Bei den substituierten Glyoxalen kann die ausschließliche oder überwiegende Entstehung einer aktiven Form dadurch erklärt werden, daß eine intermediäre Vereinigung zwischen strukturell inaktivem Substrat und dem wohl als optisch aktiv vorauszusetzenden Ferment zu einer nicht mehr symmetrisch gebauten Kombination eintritt. Man kann sich diesen Vorgang etwa folgendermaßen veranschaulichen. An einer der beiden Carbonylgruppen oder auch an beiden vermag sich das Enzym, dem wir das Symbol X — Y beilegen, anzulagern, und man sieht aus den nachstehenden, in mannigfachen Variationen denkbaren Formeln, daß hierbei sterisch ganz verschieden orientierte Gebilde entstehen können:

$$R-CO-COH \rightarrow R-C\begin{matrix}OY\\ \\ X\end{matrix}-COH \quad \text{oder} \quad R-C\begin{matrix}OX\\ \\ Y\end{matrix}-COH.$$

Die Addition eines Ferments gerade an die Carbonylgruppe erscheint begreiflich, wenn man ihm etwa den Charakter eines optisch aktiven Amins (Aminosäurentyp) erteilen will. (Natürlich kommen auch Reaktionen nach Art der Sulfit- oder Blausäure-addukte und ähnliche in Betracht.) In unserem Beispiel, beim Methyl-äthyl-acetaldehyd, kann man sich gleichfalls eine solche Anlagerung des Ferments vorstellen; es brauchte in diesem Falle selber sogar nicht einmal optisch aktiv zu sein, da ja Gebilde, wie

$$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}>\overset{*}{C}H.\overset{*}{C}H<\begin{matrix}OX\\Y\end{matrix} \quad \text{oder} \quad \begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}>\overset{*}{C}H.\overset{*}{C}H<\begin{matrix}OY\\X\end{matrix}.$$

von sich aus sogar zwei asymmetrische Zentren aufweisen.

Wir möchten bei dieser Gelegenheit auch noch auf einige andere Punkte aufmerksam machen. Bei den *asymmetrischen* Hydrolysen sind bisher nur *optisch aktive Säuren (bzw. Aminosäuren)* gewonnen worden, ein Umstand, der bei dem abweichenden Charakter dieser Vorgänge, hydrolytischen Spaltungen, erklärlich ist. Hingegen ist, wie eingangs betont wurde, der Mechanismus[1]) der Dismutation ein anderer, und nur bei ihr und bei den verwandten phytochemischen Reduktionen — sowohl von racemischen Aldehyden als von symmetrischen Ketonen und Diketonen — sind bisher *optisch aktive Alkohole* erhalten worden. Einen neuen Weg zur biochemischen Erzeugung optisch aktiver Alkohole haben jüngst *C. Neuberg* und *J. Wagner* gefunden. Er besteht in der durch Enzyme vollzogenen asymmetrischen Hydrolyse eines Esters, dessen Säureteil anorganischer Natur ist und dessen Alkoholrest asymmetrischen Bau hat. So spaltet Phosphatase d, l-Bornylortho-phosphorsäure mit solcher Geschwindigkeit, daß d- und l-Borneol isoliert werden können.

Eine *Säure*, und zwar *rechtsdrehende Mandelsäure*, entsteht nach den Untersuchungen von *Dakin*[2]) bei der Hydrolyse von racemischem Mandelsäure-äthylester durch Lipase; bei unvollständiger Zerlegung erwies sich der unverändert gebliebene Ester als linksdrehend. Aus einzelnen anderen Mandelsäure-estern entsteht bei der Lipolyse gleichfalls dextrogyre Mandelsäure. Die bedeutende stereochemische Spezifität der Esterasen ist von *R. Willstätter* und seinen Mitarbeitern[3]) mehrfach hervorgehoben worden. Bei Leber-esterase, Magen-lipase und Taka-esterase war die z. B. aus Mandelsäure-äthylester gebildete Mandelsäure rechtsdrehend, während die durch Hydrolyse mit Pankreas-lipase entstandene Säure lävogyr war. Ebenso verhielt sich der Phenyl-methoxy-essigsäure-methylester; dagegen war der Drehungssinn der aus Tropasäure-methylester durch Pankreas- bzw. Leberenzym abgespaltenen Säure entgegengesetzt.

Man kann nun wohl annehmen, daß der Unterschied zwischen einer Pankreaszelle und einer Leberzelle mindestens so groß ist, wie der zwischen Essigbakterien und Milchsäurebakterien. Er ist vielleicht größer als die Abweichung zwischen den Zellen von Bacterium ascendens und Bacterium pasteurianum, die nahe verwandte Vertreter der Essigbildner sind.

Von besonderem Interesse erscheint in diesem Zusammenhange, daß es nicht einmal verschiedenartiger Zellen bedarf, um stereochemisch verschiedene Umsetzungsprodukte aus ein und demselben Ausgangsmaterial zu gewinnen. Dieses Problem berühren Arbeiten, die vor vielen Jahren aus dem Institut *Pasteur* hervorgegangen sind und sich hauptsächlich mit dem

---

[1]) In eine ganz andere Kategorie gehört die Bereitung von l-Amylalkohol und aktivem Propylenglykol aus den Racematen (*Le Bel, Péré, Kling*); hier wird einfach in bekannter Weise der eine Antipode durch wachsende Mikroorganismen zerstört.

[2]) *H. D. Dakin*, Proc. Chem. Soc. **19**, 161, 1903; Journ. of Physiol. **30**, 253, 1904; **32**, 199, 1905.

[3]) *R. Willstätter* und *F. Memmen*, H. **138**, 216, 1924; *R. Willstätter, F. Haurowitz* und *F. Memmen*, H. **140**, 203, 1924; *R. Willstätter* und *H. Kumagawa*, H. **146**, 151, 1925.

Stoffwechsel mehrerer, Milchsäure liefernder Mikroben beschäftigen. *A. Péré*[1]) konstatierte für vier derselben, die auf ammonsalzhaltigen Nährböden gezüchtet waren, die gemeinsame Fähigkeit zur Bildung von l-Milchsäure[2]). Durch Veränderung des stickstoffhaltigen Nährmaterials (Zusatz von Pepton) gelang es, bei zwei von jenen vier Stämmen die Kraft zur Erzeugung von d-Milchsäure zu wecken. Die Isolierung geschah in Form der Zinksalze. Zwei Stämme erwiesen sich trotz aller möglichen Variationen als untauglich, d-Milchsäure hervorzubringen. In einigen Fällen wurde ein Gemisch beider Isomeren erhalten. Es geht daraus hervor, daß gewisse Erreger *nur* l-Säure produzieren. Diejenigen, die unter günstigen Bedingungen die d-Modifikation bereiten, können auch in Produzenten von l-Säure umgewandelt werden, als ob die Entstehung dieser Form leichter oder ihre Zerstörung schwieriger erfolge als die des Isomeren. *E. Kayser*[3]) zog 15 verschiedene Milchsäurebakterien heran und fand, je nach den Milieubedingungen, l-, d- und inaktive Säure. In weiteren Arbeiten von *A. Pottevin*[4]) und *A. Péré*[5]) wurden die Einflüsse von verminderter Stickstoffzufuhr, von Temperatur, Antisepticis u. a. geprüft. Verschiedene Substanzen der Kohlehydratreihe (z. B. l-Arabinose, Lactose, d-Mannit, Dulcit) ergaben alle rechtsdrehende Lactate. In neuerer Zeit haben sich amerikanische Forscher (*Peterson, Fred* u. a.) erfolgreich mit dieser Frage beschäftigt[6]). Zur Untersuchung gelangten etliche Arten von Milchsäure-Bakterien, die teils reine d-, teils reine l-Milchsäure oder auch beide Komponenten produzieren. Von Wichtigkeit ist eine Angabe über den Einfluß der Temperatur auf die entstehende Milchsäure-modifikation; *Pederson, Peterson* und *Fred* haben nämlich bewiesen, daß die Kultur R (Streptococcus lactis) bei 15° die reine Rechtsform, bei 37 und 45° die reine Linksform liefert.

Auch für Eiweiß-baustoffe konnte eine optisch differente Angreifbarkeit durch Bakterien beobachtet werden. *F. Ehrlich* und *K. A. Jacobsen*[7]) erhielten aus l-Tyrosin mittels Oidium lactis die d-Para-oxy-phenyl-milchsäure, während *Y. Kotake*[8]) von demselben Ausgangsmaterial aus im tierischen Stoffwechsel zur l-Para-oxyphenylmilchsäure gelangt war. *Sasaki* und Mitarbeiter[9]) zeigten, daß l-Tyrosin, d, l-Tyrosin und d-Tyrosin durch Bacterium proteus in d-Oxyphenyl-milchsäure, durch Bacterium subtilis in l-Oxy-phenyl-milchsäure umgewandelt werden. Bei der Spaltung von d, l-Phenyl-alanin durch Bact. proteus und subtilis tritt, wie *H. Amatsu* und *M. Tsudji*[10]) fanden, eine ähnliche Auswahl zutage; die Einwirkung des ersten Bakteriums führte zu d-Phenyl-milchsäure, die des zweiten zu l-Phenyl-milchsäure.

Bei den erwähnten alten und neuen Arbeiten über die Entstehung bald von d-, bald von l-Milchsäure aus Zucker kann man als Erklärung eine

---

[1]) *A. Péré*, Ann. Inst. Past. 6, 512, 1892; 7, 737, 1893.

[2]) Die „optische Benennung“ ist hier die alte.

[3]) *E. Kayser*, Ann. Inst. Past. 8, 737, 1894.

[4]) *A. Pottevin*, ebendaselbst 12, 49, 1898.

[5]) *A. Péré*, ebendaselbst 12, 63, 1898.

[6]) *W. H. Peterson, E. B. Fred* und *J. A. Anderson*, Journ. of biol. Chem. 58, 111, 1922; *C. S. Pederson, W. H. Peterson, E. B. Fred*, ebendaselbst 68, 151, 1926.

[7]) *F. Ehrlich* und *K. A. Jacobsen*, B. 44, 888, 1911.

[8]) *Y. Kotake*, H. 65, 397, 1910.

[9]) *T. Sasaki*, Act. Schol. Med. 1, 103, 1917; *M. Tsudji*, ebendaselbst 2, 115, 1918.

[10]) *H. Amatsu* und *M. Tsudji*, ebendaselbst 2, 447, 1918.

ähnliche Vorstellung sich bilden, wie sie für die Erzeugung sowohl der d- als auch der l-Mandelsäure aus Phenylglyoxal im *Mayer*schen Versuch gegeben worden ist. Wenn man die Methylglyoxalhypothese gelten läßt, so ist es klar, daß ganz im Sinne der an Methylglyoxal und Phenylglyoxal gemachten Beobachtungen verschiedene Erreger (über stereochemisch ungleiche Zwischenprodukte) jeweils den einen oder den anderen Antipoden der Oxysäure erzeugen können, ganz abgesehen davon, daß schon beim Abbau des Hexosemoleküls verschiedene optisch-aktive Formen[1]) des Methylglyoxals oder seiner Hydrate, etwa im Sinne der Formeln

$$CH_3.\overset{*}{C}(OH).\overset{*}{C}H(OH) \text{ (über O verbunden) oder } CH_2:C.\overset{*}{C}H(OH) \text{ (über O verbunden)},$$

auftreten können. Ähnliches wird man für die Umwandlung einer Raumform der optisch-aktiven Aminosäuren in beide entgegengesetzt drehende Modifikationen der zugehörigen Oxysäuren annehmen können, sei es, daß es sich um eine Reduktion zwischendurch auftretender Ketosäuren im Sinne von *Neubauer*, oder um die Umwandlung intermediär aus den Aminosäuren gebildeter Glyoxalderivate im Sinne von *Dakin* und *Dudley* handelt.

Wenn nun bei den von uns gemachten Beobachtungen über die asymmetrische Dismutation der eine Antipode im Überschuß entsteht, so muß dies wohl darauf beruhen, daß die entgegengesetzt drehende Form nicht in die Dismutation einbezogen, sondern irgendwie anders umgewandelt wird. Tatsächlich haben wir gefunden, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Dismutation strukturell inaktiver Aldehyde im Falle des d, l-Methyl-äthyl-acetaldehyds die Ausbeute an dem Gemisch von dextrogyrem und inaktivem Amylalkohol nicht die theoretische, sondern etwas kleiner ist, und daß das Manko an „Amylalkohol" die Größenordnung aufweist, wie sie einer anderweitigen Verwendung von l-Valeraldehyd entspricht. Bemerken wollen wir noch, daß nicht etwa unveränderter l-Valeraldehyd übrigbleibt, sondern daß er in noch unbekannter Weise verbraucht wird. Jedenfalls sind die beiden Antipoden dieses Valeraldehyds bei der biologischen Dismutation keine gleichwertigen Donatoren bzw. Akzeptoren.

Wie in unseren früheren Versuchen, wurde synthetisch bereiteter d, l-Methyl-äthyl-acetaldehyd verwendet.

Die Anstellung der Ansätze geschah unter Wahrung der Sterilität in nachstehender Weise:

Die auf der Zentrifuge gut ausgewaschenen Kulturen von Bacterium pasteurianum wurden in einer 2-Liter-Stöpselflasche in 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Der Gehalt an Bakterien-Trockensubstanz wurde jeweils mit einem aliquoten Teile ermittelt. Nach Zugabe von 20 g Kreide wurde mit Kaliumpermanganat gewaschene Kohlensäure während 10 Minuten durch die Bakterien-

[1]) Vgl. *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **51**, 499, 1913.

aufschwemmung geleitet. Sodann wurden stets 3,0 g (3,75 ccm) Methyläthyl-acetaldehyd hinzugefügt und die Flasche paraffiniert. Das Gemenge wurde im Brutschrank bei 37⁰ aufbewahrt und vielfach geschüttelt. Nach 16 Stunden war der zugefügte Aldehyd zumeist verschwunden und ein starker Druck im Gefäß bemerkbar. In Versuchen mit Aceton-Trocken-Präparaten nahm die Umwandlung etwas längere Zeit in Anspruch. Das Gemisch wurde zunächst ohne weitere Zusätze mit Wasserdampf behandelt und die 1½fache Menge des Flüssigkeitsvolumens an Destillat gesammelt. Durch anreichernde Destillationen erfolgte die Einengung des wässerigen Alkohols bis auf 20 ccm. Wenn man sich im Verlauf der Aufarbeitung davon überzeugt hat, daß kein Aldehyd mehr zugegen ist, wird zur Reinigung eine Destillation über verdünnter Schwefelsäure und eine über Lauge eingeschaltet. Die Endlösung, die in einem feinen graduierten Stöpselzylinder aufgefangen war, wurde mit Kaliumcarbonat gesättigt. Der Ertrag an dem sich quantitativ abscheidenden Amylalkohol belief sich auf etwa 85 Proz. der zu erwartenden Menge[1]). Nach dem Trocknen über geglühtem Natriumsulfat wurde der Alkohol polarisiert. In allen Fällen konnte eine bis zu 18 Proz. reichende Rechtsdrehung wahrgenommen werden. Der Amylalkohol hatte den richtigen Siedepunkt.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche zusammengestellt.

Nr. des Versuchs	Menge des angewandten Methyläthylacetaldehyds g	Trockengewicht der Bakterien g	Ausbeute an Amylalkohol ccm	Drehung (im 2 dm-Rohr) Grade	Überschuß an aktivem Alkohol Proz.	Titration der Säure
		Bacterium pasteurianum (frisch).				
1	3	17,5	3,2	+ 2,0	17,9	
2	3	12,6				
3	3	11,4	4,9	+ 1,4	12,6	Gef. 1,76 g Ber. 1,77 g
4	3	15,8				
5	3	10,9				Gef. 1,80 g Ber. 1,77 g
6	3	12,9	3,1	+ 1,5	13,5	
7	3	12,8				
8	3	13,8	1,3	+ 1,2	10,8	
		Bacterium pasteurianum (Acetonpräparate).				
9	3	25,3	1,3	+ 0,6	5,4	
10	3	29,0	1,2	+ 0,6	5,4	

[1]) Zumeist sind zwei nebeneinander angestellte Ansätze zusammen aufgearbeitet; bei Vornahme der Versuche mit den halben Mengen werden die methodischen Fehler der Amylalkohol-isolierung zu groß.

Die entstandene Valeriansäure wurde nur einige Male untersucht. Zuvor war die aus der Leibessubstanz der Bakterien durch Destillation mit Mineralsäure sekundär abgespaltene Ameisensäure nach den Angaben von *W. Brasch* und *C. Neuberg*[1]) sowie *C. Neuberg* und *F. Windisch*[2]) zerstört worden. Die Valeriansäure-lösung wurde mit Mercuri-sulfat nebst Schwefelsäure versetzt und 3 Stunden am Rückflußkühler erwärmt; nach der Filtration wurde die Flüssigkeit unter Zugabe eines Streifens Aluminiumblech der Wasserdampf-destillation unterworfen. Die Titrationsergebnisse sind gleichfalls in der Tabelle verzeichnet.

Die notwendigen Massenkulturen der Essigbakterien sind wiederum von Frau *Joel* auf Bierwürze sowie Bierwürze-agar angelegt. Der Direktion der *Schultheiß-Patzenhofer Brauerei* sind wir für die liberale Abgabe von Bierwürze zu dauerndem Danke verpflichtet.

---

[1]) *W. Brasch* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **18**, 299, 1908.
[2]) *C. Neuberg* und *F. Windisch*, ebendaselbst **166**, 467, 1925.

Fortgesetzte vergleichende Versuche über die Vergärbarkeit freier und phosphorylierter Hexosen und über eine polarimetrisch feststellbare Bindung dieser Substanzen an Inhaltsstoffe der Hefenzelle.

Von

Carl Neuberg und Maria Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Gegen die Auffassung, daß der bei der Vergärung durch Hefe umgesetzte Zucker zur Hälfte zwangsläufig über die Stufe des *Hexose-di-phosphorsäure-esters* abgebaut werde, sind verschiedene Gesichtspunkte geltend gemacht[1]). Insbesondere haben wir gezeigt[2]), daß auch mit Mazerationssäften in einem als homogen betrachteten Milieu, also unter Ausschaltung der Permeabilitätsfrage, die nicht phosphorylierten Zucker schneller und oft auch vollständiger vergären als typisches Hexose-di-phosphat. Zusatz von Cozymase vermag an diesen Verhältnissen deshalb nichts zu ändern, weil ihre Hauptwirkung ja offenbar in der raschen Herbeiführung des *Euler*-Effekts, in der Veresterung, besteht; diese Aufgabe brauchen aber die Agenzien des Systems bei Verwendung von Hexose-di-phosphorsäure-ester als fertigem Substrat nicht mehr zu lösen. Eine Folgerung aus unseren Befunden war, daß selbst im Augenblicke der Zerlegung des Zymo-di-phosphats keine besonders zerfallsbereite Form des Zuckers entsteht oder sich mindestens nicht so lange hält, daß ihr eine größere Gärgeschwindigkeit als dem in Umwandlung begriffenen Gleichgewichtszucker zukäme. Selbst bei Zugabe von Arsenat, das eine auf Phosphatase-aktivierung bezogene, in ihrer Ursache unbekannte Wirkung[3]) ausübt, wird nur die Angärung des Hexose-di-phosphorsäure-esters gegenüber der von einfachen Zuckern beschleunigt. Der Unterschied wird bald ausgeglichen, und schließlich eilt der Zerfall beim gewöhnlichen, nicht phosphorylierten Zucker dem des künstlich dephosphorylierten Esters voran. Inzwischen sind auch von

---

[1]) *C. Neuberg, E. Färber, A. Levite* und *E. Schwenk*, diese Zeitschr. **83**, 244, 1917; *C. Neuberg*, ebendaselbst **103**, 320, 1920.

[2]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **166**, 488, 1925; **174**, 480, 1926.

[3]) Nach *C. Neuberg* und *M. Kobel* (diese Zeitschr. **174**, 493, 1926) hemmt Arsenat die Phosphorylierung; es scheint aber hauptsächlich die Spaltung des Diphosphats, nicht die anderer Ester zu aktivieren.

anderer Seite Betrachtungen zu dem Problem mit dem Ziele angestellt worden, die Schwierigkeiten zu überwinden, die ein starres Festhalten an der ursprünglichen *Harden-Young*schen Gärungsgleichung in sich birgt. *A. Harden*[1]) selbst hat eine Art carboligatischer Synthese des Hexose-di-phosphats aus Bruchstücken niederer Molekulargröße in Erwägung gezogen, und ähnliche Gedanken sind auch von *Lebedew*, *Euler*, *Kluyver* sowie *Raymond* geäußert. In den Vordergrund des Interesses ist nun neuerdings die *Hexose-mono-phosphorsäure* gerückt, die *A. Harden* und *R. Robison*[2]) als Begleiter des Zymo-di-phosphats aufgefunden haben und deren Reindarstellung *R. Robison*[3]) geglückt ist. Außer dieser Hexose-mono-phosphorsäure sind noch *zwei andere* bekannt. Die eine ist von *C. Neuberg*[4]) durch partiellen Abbau des Hexose-di-phosphats mittels verdünnter Säuren gewonnen; hierbei wird der zur Carbonylgruppe in vizinaler Stellung befindliche Phosphorsäure-rest abgestoßen. Ferner existiert eine Glucose-mono-phosphorsäure, die durch gestufte Hydrolyse — sei es mit Säure, sei es mit phosphatasefreier Invertase — aus Rohrzucker-phosphorsäure bereitet werden kann[5]); bei diesen Prozeduren wird die Disaccharid-bindung im Rohrzucker-anteil des Saccharo-phosphats gelöst, während Phosphorsäure an der Glucosekomponente haften bleibt.

Für die beiden letztgenannten Hexose - mono - phosphorsäuren ist schon früher eine *Vergärbarkeit durch lebende Hefe* festgestellt und hervorgehoben[6]); hierdurch unterschieden sie sich deutlich vom Hexose-di-phosphat, das unter keinen Umständen durch lebende Hefen zur Vergärung gebracht werden konnte.

Die Vornahme eines neuen Vergleichs unter Einbeziehung des von *Robison* erhaltenen und untersuchten Isomeren hat unsere früheren Erfahrungen bestätigt. Sowohl mit lebender Oberhefe als mit frischer Unterhefe erfolgt eine langsame Vergärung aller drei Hexosen-mono-phosphate; sie setzt aber erst allmählich ein, so daß es den Anschein hat, als ob eine Dephosphorylierung oder eine andere Umformung vorangehen müsse. Außerdem bleibt auch bei 72 Stunden währender Dauer diese Vergärung unvollständig. Sie erreicht dann nur beim *Neuberg*schen Ester und mit Unterhefe etwa die Hälfte des

---

[1]) *A. Harden*, Alcoholic. Fermentation, III. Aufl., 1923, S. 109.

[2]) *A. Harden* und *R. Robison*, Proc. Chem. Soc. **30**, 16, 1914.

[3]) *R. Robison*, Biochem. Journ. **16**, 809, 1922.

[4]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 432, 1918.

[5]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, ebendaselbst **23**, 515,; **26**, 521, 1910; *I. Hatano*, ebendaselbst **159**, 175, 1925; *S. Sabetay* und *L. Rosenfeld*, ebendaselbst **162**, 469, 1925; *C. Neuberg* und *S. Sabetay*, ebendaselbst **162**, 479, 1925.

[6]) *Hatano*, *Rosenfeld*, *Neuberg* und *Sabetay*, l. c.

theoretischen Umfangs, während freier Zucker zu 50 Proz. schon in 60 bis 75 Minuten zerfallen war, wo bei allen drei Monophosphaten die Gärung noch nicht angefangen hatte.

Schneller erfolgt die *zellfreie Vergärung* dieser drei Hexosen-mono-phosphorsäuren, aber auch dabei müssen wir wieder konstatieren, daß die Spaltung der gewöhnlichen, nicht phosphorylierten Glucose sowie Fructose schneller und reichlicher vonstatten geht.

Die Unterschiede in der Vergärbarkeit der drei Hexosen-mono-phosphorsäure-ester durch lebende Hefen sind nicht so ausgesprochen, daß sie bis jetzt zu weitreichenden Schlüssen berechtigen würden.

Bei zellfreier Vergärung ist die Vorzugsstellung der nicht veresterten Zucker ebenfalls unverkennbar. Die alkoholische Spaltung setzt rascher ein und erreicht einen größeren Umfang. Zu einer Zeit, wo die Hälfte sowohl vom Trauben- als vom Fruchtzucker zerfallen ist, sind von den Mono-phosphaten nur 20 Proz. umgesetzt. Auch mit Mazerationssaft beginnt die Vergärung bei dem (durch Abbau aus Zymo-di-phosphat gewonnenen) *Neuberg*schen Mono-ester am schnellsten und ist zugleich am reichlichsten. Diese Verbindung steht allem Anschein nach der Fructose am nächsten, die, wie auch unsere Versuche wieder lehren, öfter mit größerer Geschwindigkeit als Glucose für sich gärt. Einzelheiten kann man den Tabellen I bis III entnehmen.

Wie erwähnt, tritt die schlechtere Vergärbarkeit der Monophosphate auch bei der Versuchsanordnung des zellfreien Systems zutage, und man muß sich daher fragen, welche Umstände dieses Verhalten bedingen können. Die verschiedenen Möglichkeiten sollen nicht erörtert werden, aber wir möchten auf einen Befund hinweisen, den wir in Fortführung unserer früheren diesbezüglichen Versuche[1]) gemacht haben. Wir konnten vor einiger Zeit beweisen, daß zwischen Fruchtzucker und Alanin sich im Neutralitätsbereich eine augenblicklich verlaufende Reaktion abspielt und in einer Drehungsänderung zum Ausdruck kommt. Weiterhin[2]) hatten wir gefunden, daß in besonders ausgeprägtem Maße das Hexose-di-phosphat zu einer solchen Reaktion mit verschiedenen Aminosäuren befähigt ist. Eine eintretende Vereinigung der Komponenten kann nur locker sein; denn wir haben in vergleichenden Versuchen festgestellt[2]), daß solche Gemische von Zucker und Aminosäuren keineswegs unvollständig, sondern teilweise sogar beschleunigt vergoren werden. Es ist nun denkbar, daß in entfernterer Analogie zu den bekannten Reaktionen von Phosphorsäure mit Proteinen auch die Zucker-phosphorsäuren mit Eiweiß und seinen Spaltungsprodukten in eine Kombination

[1]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **162**, 496, 1925.
[2]) *Dieselben*, ebendaselbst **174**, 464, 1926.

Tabelle I. Vergärungen mit frischer Patzenhofer Unterhefe.

Zeit	ccm CO_2 aus je 10 ccm Gärgemisch bei 27° — 1 g frische Unterhefe und Substratkonzentration gleich					
	m/8 Fructose	m/8 Glucose	m/8 Hexose-mono-phosphat a*)	m/8 Hexose-mono-phosphat b**)	m/8 Hexose-mono-phosphat c***)	—
Zu Beginn . .	0	0	0	0	0	0
Nach 1/4 Std. .	4,5	4,6	0	0	0	0
„ 1/2 „ .	12,6	13,3	0	0	0	0,1
„ 3/4 „ .	22,3	26,0	0,1	0	0	0,2
„ 1 „ .	30,2	35,0	0,1	0	0	0,2
„ 1 1/2 „ .	38,4	42,4	0,4	0,5	0,2	0,2
„ 1 3/4 „ .	40,0	43,4	0,4	0,5	0,2	0,3
„ 3 „ .	44,6	46,0	0,5	1,3	0,2	1,0
„ 4 „ .	46,6	47,6	0,5	1,3	0,2	1,0
„ 8 1/2 „ .	48,0	48,1	3,1	2,1	1,0	1,0
„ 23 „ .	51,8	51,6	5,8	5,4	1,1	2,7
„ 34 „ .	52,8	52,1	13,0	10,0	6,9	2,7
„ 46 „ .	53,7	53,7	16,9	13,0	11,2	3,0
„ 48 „ .	54,6	54,6	18,0	13,8	12,6	3,4
„ 51 „ .	55,6	55,2	19,6	15,1	14,5	3,6
„ 53 „ .	55,6	55,2	20,5	15,9	15,7	3,6
„ 55 „ .	55,6	55,2	21,5	16,6	16,9	3,6
„ 72 „ .	56,0	55,2	26,3	20,8	22,3	3,6

*) a = hexose-mono-phosphorsaures Natrium aus Zymo-di-phosphat (*Neuberg*scher Ester).
**) b = hexose-mono-phosphorsaures Natrium aus Saccharosephosphat.
***) c = Natriumsalz der *Robison*schen Säure.
Diese Bezeichnung (a, b, c) wird auch im folgenden beibehalten.

Tabelle II. Vergärungen mit frischer Oberhefe Sinner.

Zeit	ccm CO_2 aus je 10 ccm Gärgemisch bei 27° — 1 g frische Oberhefe und Substratkonzentration gleich					
	m/8 Fructose	m/8 Glucose	m/8 Hexose-mono-phosphat a	m/8 Hexose-mono-phosphat b	m/8 Hexose-mono-phosphat c	—
Zu Beginn . .	0	0	0	0	0	0
Nach 1/4 Std. .	0,3	0,3	0	0	0	0
„ 1/2 „ .	2,4	2,2	0	0	0	0
„ 3/4 „ .	7,8	8,4	0	0	0	0
„ 1 1/4 „ .	23,0	26,5	0,2	0,3	0	0,1
„ 1 1/2 „ .	27,0	32,5	0,2	0,6	0	0,1
„ 3 „ .	37,8	41,5	0,2	1,2	0,1	0,1
„ 4 „ .	39,7	43,6	0,2	1,2	0,1	0,1
„ 8 1/2 „ .	42,1	43,7	1,2	3,1	0,3	0,1
„ 23 „ .	43,1	47,0	1,9	3,7	0,3	0,1
„ 34 „ .	43,2	47,0	7,9	5,5	2,6	0,1
„ 46 „ .	44,4	48,6	10,0	5,7	2,6	0,4
„ 48 „ .	45,4	49,5	10,7	6,0	2,9	0,4
„ 51 „ .	45,9	50,0	11,7	6,4	3,5	0,4
„ 53 „ .	45,9	50,0	12,4	6,6	3,9	0,4
„ 55 „ .	45,9	50,1	12,8	6,8	4,5	0,4
„ 72 „ .	46,0	50,0	17,0	9,1	9,0	0,4

Tabelle III.

Zellfreie Vergärungen.

Zeit	ccm CO_2 aus je 30 ccm Gärgemisch bei 26°					
	Substratkonzentration gleich					
	m/12 Fructose	m/12 Glucose	m/12 Hexose-mono-phosphat a	m/12 Hexose-mono-phosphat b	m/12 Hexose-mono-phosphat c	—
Zu Beginn . .	0	0	0	0	0	0
Nach 1/4 Std. .	0	0	0	0	0	0
„ 1/2 „ .	2,2	0	Spur	0	0	0
„ 1 1/4 „ .	33,4	19,0	12,0	5,1	7,4	0
„ 1 1/2 „ .	34,7	26,0	12,7	5,1	7,4	0
„ 1 3/4 „ .	36,0	31,8	12,9	5,1	7,4	0
„ 2 1/2 „ .	39,4	39,0	13,2	5,1	7,4	0
„ 4 „ .	47,2	48,5	18,4	11,6	20,3	0
„ 10 „ .	66,0	65,8	25,8	11,5	21,9	0
„ 22 „ .	—	—	34,3	12,2	27,8	0
„ 24 „ .	—	—	39,0	12,7	30,0	0
„ 26 „ .	—	—	42,4	13,1	32,2	0
„ 28 „ .	—	—	44,4	13,5	33,9	0
„ 30 „ .	—	—	45,5	13,8	35,0	0
„ 32 „ .	—	—	46,7	14,0	35,8	0
„ 48 „ .	—	—	49,2	15,3	38,6	0

treten, die eventuell nur langsam oder unvollständig reversibel gemacht wird. Um dieses zu prüfen, haben wir als Reagens direkt Hefensaft benutzt, der 24 Stunden alt und nicht mehr gärfähig war. Man muß, um polarimetrisch die Vorgänge verfolgen zu können, dabei einen Kunstgriff anwenden. Der Mazerationssaft ist, wie früher der eine von uns festgestellt hat[1]), schwach lävogyr, aber er ist für gewöhnlich dunkel und ein wenig opak. Eine für die optische Durchsicht ausreichende Klärung erreicht man durch ganz kurzes Erwärmen im Wasserbad bis zu dem Augenblick, in dem eine deutliche, Flocken liefernde Koagulation erfolgt. Dabei muß man fortgesetzt rühren. Wenn man dann die Flüssigkeit noch warm mit hinreichend Tierkohle schüttelt, so erhält man nach Filtration eine nur gelbstichige Lösung von Inhaltstoffen der Hefenzellen, mit der die polarimetrischen Bestimmungen unschwer auszuführen sind.

Fügt man zu einem solchen Safte nun in Analogie zu unseren früheren Versuchen gewöhnlichen Fruchtzucker oder die Hexose-mono-phosphorsäure-ester (letztere als Natriumsalze), so konstatiert man scharfe Drehungsänderungen[2]), über deren Größe die Tabellen IV, IVa, V, Va, VI und VIa Auskunft erteilen.

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 56, 498, 1913.

[2]) Diese Reaktionen der Zucker und besonders der Zuckerester gedenken wir weiter zu studieren.

Polarimetrische Prüfungen.

Tabelle IV.

Zeit	3 mol. Fructose + Hefensaft. $p_H = 7$			
	3 ccm 3 mol. Fructose + 3 ccm Wasser	3 ccm Saft + 3 ccm Wasser	3 ccm 3 mol. Fructose + 3 ccm Saft	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	— 25,86°	— 0,67°	— 27,80°	1,27°
Nach 1/4 Std. .	— 25,94	— 0,65	— 27,95	1,36
„ 1/2 „ . .	— 26,00	— 0,64	— 27,98	1,34
„ 1 „ . .	— 26,00	— 0,64	— 28,00	1,36
„ 1 1/2 „ . .	— 25,95	— 0,64	— 27,95	1,36
„ 5 1/2 „ . .	— 25,90	— 0,65	— 27,92	1,37

Drehungsänderung nach links.

Tabelle IVa.

Zeit	3 mol. Fructose + Hefensaft. $p_H = 7$			
	3 ccm 3 mol. Fructose + 3 ccm Wasser	3 ccm Saft + 3 ccm Wasser	3 ccm 3 mol. Fructose + 3 ccm Saft	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . .	— 25,50°	— 0,66°	— 27,42°	1,26°
Nach 1 Std. . .	— 25,60	— 0,64	— 27,50	1,26
„ 2 „ . .	— 25,63	— 0,64	— 27,55	1,28

Drehungsänderung nach links.

Tabelle V.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium aus Zymo-di-phosphat + Hefensaft. $p_H = 7$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Saft + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Saft	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn .	+ 0,76°	— 0,63°	+ 0,90°	0,77°
Nach 1 Std. .	+ 0,76	— 0,65	+ 1,46	1,35
„ 15 Std. .	+ 0,76	— 0,65	+ 1,85	1,74

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle Va.

m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium aus Zymo-di-phosphat + Hefensaft. $p_H = 7$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Saft + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Saft	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn .	+ 0,75°	— 0,66°	+ 0,99°	0,90°
Nach 1/2 Std. .	+ 0,77	— 0,65	+ 1,37	1,25

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VI.
m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + Hefensaft. $p_H = 7$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Saft + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Saft	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn	+ 1,15°	— 0,64°	+ 1,15°	0,64°
Nach 1 Std.	+ 1,15	— 0,65	+ 1,16	0,66
„ 2 Std.	+ 1,16	— 0,65	+ 1,16	0,65
„ 3 „	+ 1,18	— 0,64	+ 1,18	0,64
„ 4 „	+ 1,20	— 0,65	+ 1,21	0,66

Drehungsänderung nach rechts.

Tabelle VIa.
m/2 hexose-mono-phosphorsaures Natrium (nach *Robison*) + Hefensaft. $p_H = 7$.

Zeit	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Wasser	3 ccm Saft + 3 ccm Wasser	3 ccm m/2 Hexosephosphat + 3 ccm Saft	Δ (l = 1 dcm)
Zu Beginn . . .	+ 1,20°	— 0,65°	+ 1,16°	0,61°
Nach $1^1/_2$ Std. .	+ 1,18	— 0,64	+ 1,18	0,64

Drehungsänderung nach rechts.

Es muß zunächst dahingestellt bleiben, ob es sich dabei um Kombination des Zuckers und der Zucker-phosphorsäure-ester mit genuinem Hefeneiweiß handelt, oder ob im Hefensaft vorhandene proteolytische Abbauprodukte beteiligt sind. Die Drehungsänderungen, die wir mit Hefensaft bei seiner Einwirkung auf die Zucker gefunden haben, sind durchaus den früher von uns beschriebenen Effekten von Eiweißbausteinen vergleichbar, und man darf ihnen dieselbe Bedeutung für Fragen der Gärungs- und Blutzucker-physiologie beimessen, auf die wir damals hingewiesen hatten.

Die Umsetzungsmöglichkeit von Zucker mit Zellinhaltsstoffen ist schon oft Gegenstand der Erörterung gewesen. Eine große Literatur liegt über die Frage vor, ob Kohlehydrate sich mit Eiweiß zu mehr oder minder festen Addukten vereinigen können. Am Anfang dieser Forschungen stehen die Untersuchungen von *F. Schenk*[1]), der eine Verbindung von Traubenzucker mit den Proteinen des Blutserums angegeben hat, und das Problem hat einen gewissen Abschluß in den Arbeiten von *L. Langstein*[2]) gefunden, der gleichfalls einen lockeren Zusammentritt von verschiedenen Zuckern mit Globolinen beobachten

[1]) *F. Schenk*, Pflügers Arch. **46**, 607, 1890.
[2]) *L. Langstein*, Monatsh. f. Chem. **24**, 445, 1903; **25**, 453, 1904; H. **42**, 171, 1904.

konnte. Auf anderer Grundlage, als wir sie früher für unsere polarimetrischen Untersuchungen gewählt hatten, ist jüngst von *H. Pringsheim* und *M. Winter*[1]) eine Kondensierbarkeit von Zucker mit Eiweiß dargetan; sie beschreiben, daß pepsinverdaute Proteine sich mit den Produkten der Amylolyse, insbesondere auch mit Maltose, derartig verbinden, daß — mit *Fehling*scher Lösung gemessen — das ursprüngliche Reduktionsvermögen des Zuckers vermindert ist. In diesem Zusammenhange muß ferner auf ältere, sehr interessante Feststellungen von *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*[2]) verwiesen werden, nach denen die in den Nucleinsäuren vorgebildeten Pyrimidine sich in wässeriger Lösung mit Mono- und Di-sacchariden zu Körpern von glucosidischer Struktur vereinigen.

Der *Schultheiß-Patzenhofer-Brauerei* haben wir für die Gewährung von Hefe sehr zu danken.

---

[1]) *H. Pringsheim* und *M. Winter*, diese Zeitschr. **177**, 406, 1926.
[2]) *S. J. Thannhauser* und *G. Dorfmüller*, Ber. **47**, 1304, 1914.

Über die Vorgänge im frischen und getrockneten Tabakblatt vor und während der Fermentation.

Von

Carl Neuberg und Maria Kobel[1]).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Inhalt.

---

[1]) Über einige Ergebnisse haben wir kurz im Heft der „Naturwissenschaften" vom 10. Dezember berichtet.

Anhang.

Wenn bisher über die meisten Vorgänge bei der Tabakgewinnung ein undurchsichtiger Schleier gebreitet ist, so müssen verschiedene Ursachen hierfür verantwortlich gemacht werden. Die Prozeduren, denen der Tabak zur Überführung in das verwendungsfähige Endprodukt unterworfen wird, werden teilweise in fernen Ländern geübt und als Geheimnisse der Fabrikation gehütet. Die an den verschiedenen Stellen der Erde im Gebrauch befindlichen Methoden sind allem Anschein nach unter sich nicht gleich. Wird doch Tabak in den Tropen wie bis nahe zum Polarkreis kultiviert, und die manchmal primitiven Vorrichtungen zur Vorbereitung, Trocknung und Weiterverarbeitung des geernteten Tabakblattes unterscheiden sich naturgemäß unter den abweichenden klimatischen Verhältnissen nicht unbeträchtlich. Die Behandlung des Tabakblattes ist verschieden, indem sie zwischen den Extremen der einfachen Trocknung und denen einer regelrechten Vergärung schwankt. Die Temperaturen, die bei diesen Hergängen zur Anwendung gelangen, sind nicht scharf festgelegt, sondern werden in den Betrieben vielfach nach Empirie gewählt. Diese Verhältnisse tragen dazu bei, daß z. B. selbst bei Verwendung identischer Sorten aus unmittelbar benachbarten Orten der tabakbauenden Bezirke Deutschlands ganz ungleiches Material auf den Markt kommt.

Die hieraus sich ergebenden Schwierigkeiten für eine Beurteilung derjenigen chemischen Vorgänge, die nach Erntung des Tabakblattes ablaufen, sind überaus groß. Abgesehen von einer Differenz der Arten, die mit Abhängigkeit von Düngung und Standort in gewissen physiologischen Grenzen eine ungleiche chemische Zusammensetzung der einzelnen Sorten von Tabakblättern bedingen kann, muß es einen bedeutenden Unterschied ausmachen, ob lediglich eine schnelle Dörrung oder eine mit Vergärung verbundene langsame Trocknung oder eine regelrechte Fermentation nach vorausgegangener gesonderter Trocknung eingeleitet und durchgeführt worden ist. Das Problem wird weiter dadurch kompliziert, daß man zu unterscheiden hat zwischen rein chemischen und biochemischen Umsetzungen im gepflückten Tabakblatt, und daß beide Vorgänge beeinflußt werden einerseits durch die Substanzen und Agenzien des reifen Tabakblattes selber und der auf ihm angesiedelten Mikroorganismen andererseits.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen betreffen von den vielen sich aufdrängenden Fragen zunächst nur einen Ausschnitt.

Sie bringen Beiträge zur Kenntnis der Umwandlungen, denen die Kohlehydrate des Tabakblattes unterworfen sind. Versucht man, aus den bekannten und ausgezeichneten Lehrbüchern der Tabakkunde (*v. Babo-Hoffmann*, *Kißling*, *Witte* und *Wolff*) hierüber Auskunft zu erlangen, so begegnet man der Schwierigkeit, daß schon infolge mangelhafter Kenntnis von der Zusammensetzung des Tabakblattes die Verfasser der betreffenden Werke hierüber nur wenig anzuführen vermögen. Im Vordergrund des Interesses haben fast immer Betrachtungen der Vorgänge gestanden, die sich an den stickstoffhaltigen Bestandteilen (Eiweiß, Amiden sowie Nicotin und Nebenalkaloiden) abspielen, oder Untersuchungen über die Mineralstoffbestandteile des Tabaks in ihrem Einfluß auf die Güte des Enderzeugnisses. Die Umwandlung stickstoffhaltiger Bestandteile besteht nach den Angaben der Literatur[1]) zum Teil in einer mehr oder weniger weitgehenden Proteolyse genuiner Eiweißkörper, teils in einer Umformung vorhandener Säureamide[2]), teils in einer Desaminierung, zum Teil auch in Veränderungen des Nicotins und anderer flüchtiger Basen. Die letzteren sind, da das Nicotin den charakteristischen Bestandteil des Tabaks ausmacht, besonders eingehend untersucht, aber mit widerspruchsvollen Ergebnissen[1]). Nach Daten des Schrifttums ist der Gesamtstickstoffgehalt in der vergleichbaren Trockensubstanz vergorener Tabakblätter nicht immer deutlich gegenüber dem Stickstoffgehalt des frisch geernteten Blattes verringert. Das würde besagen, daß wohl Umgruppierungen im Stickstoffmaterial stattfinden können, nicht aber dessen weitgehende Eliminierung zu erfolgen braucht.

Anders liegen die Verhältnisse bezüglich der *Kohlenhydrate des Tabaks*. Bei dem mit Reifungszustand und Tageszeiten wechselnden Gehalt der Blätter an Stärke unterliegt die Menge der Zuckerarten in Tabakblättern naturgemäß großen Schwankungen. Nach einer Angabe von *H. Müller-Thurgau*[3]) kommen im vollreifen Tabakblatt bis 43 Proz. von der Trockensubstanz an Stärke vor. Einer Dissertation von *D. Tollenaar*[4]) entnehmen wir, daß bei dem in Niederländisch-Indien gebräuchlichen Vorgehen die Blätter möglichst vor Tagesanbruch geerntet werden, also zu einem Zeitpunkte, wo infolge der nächtlichen Respiration jenes Polysaccharid weitgehend verbraucht ist. Aber eine solche Behandlung ist nicht überall üblich und keines-

[1]) *Kißling*, *Nessler* u. a.

[2]) Interessante Einzelheiten über peptonisierende und ammonisierende Fermente siehe bei *A. Smirnow*, *M. Maschkowzew*, *M. Drboglaw* und *P. Erygin*, Berichte des russischen zentralen Instituts für Tabakforschung, Ergebnisse des Jahres 1925.

[3]) *H. Müller-Thurgau*, Landw. Jahrb. **14**, 465, 1885.

[4]) *D. Tollenaar*, Proefschrift, 1925.

wegs macht die Stärke den beständigen und konstantesten Kohlenhydratbestandteil der Tabakblätter aus. So wird der nicht zu vernachlässigende Gehalt des unfermentierten Tabakblattes an Rohcellulose zu 8 bis 10 Proz. angegeben, während er bei fermentiertem Material höher zu veranschlagen ist.

Eine analytische Beschäftigung mit den Substanzen des Tabakblattes zeigte uns, daß eine große Körperklasse bisher allem Anschein nach gänzlich für die Bedeutung der im Tabakblatt sich vollziehenden Umsetzungen unbeachtet geblieben ist. Das ist die Gruppe der *Furoide*. Die letzteren findet man im wesentlichen in dreierlei Gestalt in der Natur vor, als Pentosane, als Pektinstoffe und als Glucuronide, von denen letztere sowohl als kondensierte Kohlenhydrate wie als Saponine auftreten. Nur über ein Vorkommen von Pektin liegen kurze Literaturangaben vor. Bereits im Jahre 1868 haben *Th. Schloesing* und *L. Grandeau*[1]) Analysen veröffentlicht, aus denen ein Auftreten von Pektinsäure (acide pectique) im Tabak sich ergeben würde. Der Durchschnittswert für den Gehalt verschiedener Tabaksorten an Pektinen, an deren Anwesenheit allerdings *J. König*[2]) zweifelt, ist nach den Zahlen der Literatur auf rund 10 Proz. zu veranschlagen. Das käme der Hälfte der vorhandenen Holzsubstanz, also einem wesentlichen Teil des harten Gerüstmaterials im Tabakblatt, gleich. Es ist nicht ganz klar, ob die Zahlen der französischen Autoren sich auf frischen, getrockneten oder vergorenen Tabak beziehen. Im experimentellen Teil dieser Mitteilung wird berichtet werden, daß tatsächlich große Mengen Furfurol, 5 Proz. der Trockensubstanz und mehr, aus Tabak gewonnen werden können. Dies gilt sowohl für frische als getrocknete wie fermentierte Blätter.

Bei unseren Untersuchungen über flüchtige Bestandteile des Tabaks stießen wir unter anderem auf den *Methylalkohol* (s. S. 470). Nach den grundlegenden Untersuchungen von *Th. von Fellenberg*[3]) einerseits sowie von *F. Ehrlich*[4]) andererseits ist Methanol ein Baustein der Pektine. Das führte uns zu der Vermutung, daß die soeben erwähnten Furoide mindestens zum Teil in Form von Pektin im Tabakblatt enthalten sind. Das Furfurol, das durch Destillation mit Salzsäure aus Pektin hervorgeht, entstammt einer doppelten Quelle, einmal den im Riesenmolekül der Pektine nach *Ehrlich* vorhandenen Pentosanen,

---

[1]) *Th. Schloesing* und *L. Grandeau*, Le Tabac, S. 34 und 79. Paris 1868.

[2]) *J. König*, Chemie d. menschl. Nahrungs- u. Genußm. III, 3, 306, 1918.

[3]) *Th. v. Fellenberg*, Mitt. aus dem Geb. d. Lebensmitteluntersuchungen u. Hygiene des Schweizer Gesundheitsamtes 5, 172 u. 225, 1914; Chem. Centralbl. 1914, II, 501 und 942; diese Zeitschr. 85, 45 und 118, 1918.

[4]) *F. Ehrlich*, Chemiker-Ztg. 41, 197, 1917; *F. Ehrlich* und *R. v. Sommerfeld*, diese Zeitschr. 168, 263, 1926.

andererseits der d-Galakturonsäure; diese ist in hervorragender Weise am Aufbau der Pektine als deren Elementarkörper mit saurer Funktion beteiligt, und sie spaltet gleich der ihr isomeren d-Glucuronsäure bei Behandlung mit heißer Mineralsäure ein Molekül Kohlendioxyd ab. Nach der von *K. U. Lefèvre* und *B. Tollens*[1]) zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Uronsäure empfohlenen und seither von *Ehrlich* und *v. Sommerfeld* (l. c.), *Nanji*, *Paton* und *Ling*[2]), *Norris* und *Schryver*[3]), *O'Dwyer*[4]) sowie *Schmidt* und *Vocke*[5]) auf die Pektine angewendeten Methodik konnten wir leicht die Gegenwart einer Uronsäure in Tabakblättern nachweisen. Zudem konnten wir eine Substanz aus Tabak abscheiden, mit der die Naphthoresorcin-reaktion in der für Uronsäuren charakteristischen Weise positiv ausfällt. Diese Probe tritt nicht allein mit Glucuronsäure, sondern auch mit Galakturonsäure (Aldehyd-schleimsäure) ein[6]). Hält man diese Befunde von Furfurol, Methylalkohol, Kohlensäure und mit Naphthoresorcin typisch reagierender Substanz zusammen, so gelangt man zu der Überzeugung, daß *Schloesing* und *Grandeau* in ihrer vor nahezu 60 Jahren erschienenen Abhandlung in bezug auf ein Vorkommen von Pektin im Tabak das Richtige getroffen haben. Namentlich aber haben wir festgestellt, daß der Methylalkohol im Tabakblatt in einer Form präformiert ist, welche auf nichts anderes als auf Pektin zurückgeführt werden kann. Nach den angeführten Untersuchungen von *v. Fellenberg* und *Ehrlich* liegt im Pektin ein Methylester vor. Tatsächlich gelang es uns, aus den zu den Analysen verwendeten 25 verschiedenen Sorten von Tabak ganz ungleicher Herkunft ausnahmslos durch milde Verseifung Methylalkohol in der für Pektin kennzeichnenden Weise abzuspalten.

Bei diesen Untersuchungen haben wir weiterhin beobachtet, daß auch ohne die zur Hydrolyse meist benutzte Lauge schon durch einfache Destillation mit Wasserdampf bei praktisch neutraler Reaktion 25 bis 40 Proz. des Methylalkohols in Freiheit gesetzt werden. Fast genau so verhielt sich, was, soviel wir sehen, noch nicht bekannt gewesen ist, ein Rohpektin aus Rüben. Daß Methylalkohol in Gestalt einer leicht Holzgeist verlierenden Vorstufe im Tabakblatt vorkommt, ist bemerkenswert, und dieses Ergebnis erschien uns in bezug auf die Verwendung, die das Tabakblatt schließlich findet, von so beacht-

[1]) *K. U. Lefèvre* und *B. Tollens*, B. **40**, 4517, 1907.
[2]) *D. R. Nanji*, *F. J. Paton* u. *A. R. Ling*, Chem. Centralbl. **1925**, II, 394.
[3]) *F. W. Norris* und *S. B. Schryver*, Biochem. Journ. **19**, 692, 1925.
[4]) *M. H. O'Dwyer*, ebendaselbst **20**, 656, 1926.
[5]) *E. Schmidt* und *F. Vocke*, B. **59**, 1585, 1926.
[6]) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **18**, 148, 1908; *F. Ehrlich*, l. c., 1917.

licher Bedeutung, daß wir eine große Reihe von Tabaksorten in verschiedenem Zustande — frisch geerntet, getrocknet und vergoren — auf den Gehalt an abspaltbarem Holzgeist geprüft haben.

Dabei hat sich nun eine überraschende Tatsache ergeben. Die Menge des gesamten, zunächst in Esterform vorhandenen Methylalkohols betrug in frischen Blättern mit großer Regelmäßigkeit 7 bis 8 Prom., berechnet auf die Trockensubstanz. Zu dieser Zahl sind wir durch Untersuchungen an sechs im Garten des hiesigen Instituts kultivierten Sorten[1]) gelangt.

Nun hatten uns die Furfurol- und Kohlendioxyd-bestimmungen in getrockneten und vergorenen Tabaken gezeigt, daß diese Bausteine des Pektins die Prozeduren der Wasserentziehung und Fermentation überdauern, also offenbar recht beständig sind. Von großem Interesse war die Frage: gilt ein gleiches auch für den Methylalkohol? Das Resultat der Prüfung von 25 Sorten ungleicher Provenienz war folgendes: Überall ist Methylalkohol zugegen. In gebrauchsfähigen, dunkelfarbigen Zigarrentabaken betrug der Methylalkoholgehalt nur noch durchschnittlich 1 Prom. Er war also auf den siebenten bis achten Teil des ursprünglichen Wertes frischer Blätter herabgesunken. Bezieht man diese Zahlen auf die wasserfreie Substanz dachreifer Blätter, so macht der Methylalkoholgehalt nach der Fermentation sogar nur noch $^1/_9$ bis $^1/_{11}$ des Anfangswertes aus. Diese Feststellung haben wir getroffen für Hockenheimer Tabak als deutsches Erzeugnis und für folgende exotische Tabaksorten: Sumatra I, II, Java, Bezocki-Java, Java-Kuba, Domingo I, II, Maryland, Kentucky, Brasil, St. Felix, Trapezunt.

Was unvergorenen und getrockneten Tabak anbelangt, so waren wir bisher nur imstande, ein in Deutschland angebautes und hier getrocknetes Gewächs zu verwenden. An diesem Material haben wir ermitteln können, daß durch den Prozeß der Trocknung, Dachreifung, allein der Methylalkohol nicht abgespalten wird, sondern daß im Gegenteil der Methoxylgehalt der Trockensubstanz ansteigt; das ist erklärlich, weil andere Substanzen, insbesondere die Stärke, während der Dachreife verschwinden. Von den überseeischen Sorten standen uns vorläufig lediglich gebrauchsfähige Blätter für unsere Untersuchungen zu Gebote. Selbstverständlich haben wir bei den nicht selbst gezogenen Rohstoffen nicht fertige Zigarren- oder geschnittene Rauch-tabake benutzt, sondern zur Schaffung durchsichtiger Verhältnisse die unverarbeiteten Blätter, wie sie im gebündelten und verwendungsbereiten Zustande importiert werden.

---

[1]) Herrn Geheimrat *Busse* sind wir für die Überlassung von Pflänzchen, die von ihm aus reinem Samen gezogen waren, zu wärmstem Danke verpflichtet.

Da der Methylalkohol bis jetzt nicht als ein Bestandteil der Tabakblätter isoliert worden war, haben wir ihn nicht allein durch Reaktionen und quantitative Analysen (nach drei verschiedenen Methoden) nachgewiesen, sondern auch seine Darstellung in Substanz durchgeführt, von der wir 10 ccm in corpore haben abscheiden können. Er ist damit wohl überhaupt zum ersten Male aus einem Pektinkörper in natura erhalten und durch seine physikalischen Konstanten charakterisiert worden.

Für die Frage nach den Vorgängen bei der Tabaktrocknung und Fermentation erscheint nun folgende Beobachtung von Bedeutung. Den geringen Methoxylgehalt haben wir an den angegebenen 13 fertigen, dunkelfarbigen Zigarren- und Pfeifentabaken konstatiert. Zwar hat es uns bislang an der Möglichkeit gefehlt, die exotischen Sorten in frischem Zustande auf ihren Ertrag an gebundenem Holzgeist zu prüfen, aber die Arten, die in Deutschland gezüchtet und von uns herangezogen sind, stammen von Gewächsen ab, die in den zuvor gekennzeichneten fremden Gebieten heimisch sind. Es ist zunächst nicht sehr wahrscheinlich, daß in der Zusammensetzung der frischen Tabakblätter ganz prinzipielle Unterschiede in bezug auf den Methoxylgehalt sich geltend machen werden, je nachdem sie hier oder in fremden Gegenden heranwachsen; jedoch gedenken wir, diese Frage nebst ihren Konsequenzen im nächsten Jahre zu prüfen. Bekräftigt wird unser Ergebnis zunächst durch den Umstand, daß in Deutschland gebauter und in Deutschland vergorener Tabak im frischen Zustande den Reichtum an gebundenem Methylalkohol und, ganz in der Größenordnung der fremden Produkte, nach erfolgter Fermentation einen geringeren Gehalt an Holzgeist aufwies.

Vielfach in der Gestalt der Blätter, noch mehr in der Farbe weichen nun die Zigaretten- und hellen Pfeifen-tabake von den dunklen Sorten ab. Dies deutet darauf hin, daß ihre Vorbehandlung anders ist, d. h. daß sie keine oder aber eine kurz dauernde Vergärung durchgemacht haben und vorwiegend nur in getrockneter Form verwendet werden. Auf das beste mit einer solchen Auffassung würde nun die Tatsache harmonieren, auf die wir in diesem Zusammenhange die Aufmerksamkeit lenken müssen, nämlich der Umstand, daß alle diese hellen Sorten im Zustande, in dem sie zur Benutzung gelangen, einen hohen Methoxylgehalt besitzen. Er beträgt im Mittel nach unseren Untersuchungen an sechs Sorten 5 bis 7 Prom., ist also nahezu ebenso groß, wie der von getrockneten frischen Blättern.

Wir werden in Fortsetzung dieser Studien bemüht bleiben, frische und als gebrauchsfertig bezeichnete exotische Sorten nach dieser Richtung hin zu untersuchen sowie ausfindig zu machen, durch welche

Eingriffe und zu welcher Zeit Methylalkohol aus der Ursprungssubstanz in Freiheit gesetzt wird.

Aber schon heute glauben wir auf den Befund hinweisen zu dürfen, daß nach der technischen Zubereitung, die hier sicherlich zum Teil in einer regelrechten Fermentation besteht, der Methylalkoholgehalt bei den *dunkelfarbigen* Zigarren- und Rauch-tabaken außerordentlich erheblich gesunken ist.

Dieses Verhalten bietet auch ein Interesse für hygienische und pharmakologische Fragen. Man wird annehmen dürfen, daß der so leicht abgegebene Holzgeist beim Glimmprozeß entweder unverändert entweicht oder zu Formaldehyd oder Kohlenoxyd wird. In allen diesen Fällen handelt es sich um Substanzen, deren Einatmung beim Rauchen sicherlich unerwünscht ist; denn die Schleimhäute des Mundes sowie des Nasen-Rachenraums stellen außerordentlich kräftig resorbierende Flächen dar, von denen aus der Methylalkohol mit Leichtigkeit in die Zirkulation geraten würde. In Verbindung damit muß die Tatsache angeführt werden, daß nach neuerlichen Beobachtungen bei der Verwendung von selbstgezogenen und nicht vergorenen dunklen Tabaken mehrfach Sehstörungen beobachtet worden sind[1]). Man könnte sich vorstellen, daß in Gegenwart sonst durch Fermentation entfernter Stoffe die Verbrennung des Methylalkohols im Rauchtabak noch unvollständiger bleibt als etwa in der normalen Zigarette. Im gewissen Sinne würde die Erfahrung über den schwächeren Methylalkoholgehalt des Zigarrentabakes auch mit der oft auftretenden Behauptung im Einklang stehen, daß die Zigarre als leichter bekömmliches Rauchgut zu gelten hat.

Ob die erwähnte Ablösung von Methylalkohol sich auf ein Ferment zurückführen läßt, etwa auf die Pektase, der die Fähigkeit zur Hydrolyse von Pektinestern zugeschrieben wird, muß den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden. Methylalkohol kann in der Pflanze wohl durch phytochemische Reduktion von Formaldehyd entstehen[2]); man kann die Frage aufwerfen, ob die Anhäufung von Holzgeist in Gestalt des Pektinsäure-esters ein reiches, jederzeit zur Verfügung stehendes und bewegliches Depot für die Bildung der methylierten Stickstoffbasen darstellt, die im Nicotin, N-Methylpyrrolin, den Nebenalkaloiden und im Betain[3]) vorhanden sind. Umgekehrt wird nach einer jüngst von *A. Fodor* und *A. Reifenberg* gemachten, äußerst bemerkenswerten Angabe[4])

[1]) Vgl. hierzu *H. Rhode,* Chem. Centralbl. **1928,** IV, 542.
[2]) *C. Neuberg* und *E. Welde,* diese Zeitschr. **67,** 104, 1914.
[3]) *N. T. Deleano* und *G. Trier,* H. **79,** 243, 1912.
[4]) *A. Fodor* und *A. Reifenberg,* Chem. Centralbl. **1926,** I, 1620.

durch eine Oxydase Nicotin teilweise zu Pyridin, Methylamin und Kohlendioxyd abgebaut.

Als eine Schwierigkeit für die Einsicht in dieses ganze Gebiet macht sich der Umstand fühlbar, daß eine Superposition verschiedener Vorgänge während der natürlichen Umwandlung des frischen Tabakblattes in das genußfähige Endprodukt statthat. Außer rein chemischen Umsetzungen kommen, wie erwähnt, die enzymatischen Prozesse in Betracht, die von den im Tabakblatt vorhandenen Enzymen ausgehen, dann aber auch jene Umformungen, die von der Mikroorganismenflora verursacht werden. Auf dem Tabakblatt sind Pilze und Bakterien angesiedelt und sowohl während des Trocknungsvorgangs als namentlich bei der angeschlossenen Fermentation tätig. Die erste Phase der Tabakzubereitung besteht darin, daß die Blätter einer langsamen Trocknung bei Raumtemperatur unterworfen werden; dabei findet eine allmähliche Verdunstung der Hauptmenge des Wassers statt. Aber die Kleinlebewesen sowie immanente Blattenzyme haben während dieser „Dachreifung" hinlänglich Zeit zur Entfaltung ihrer Kräfte.

Wie eingangs hervorgehoben wurde, sind die Kohlehydrate bisher in ihren Beziehungen zu den Vorgängen bei der eigentlichen Tabakfermentation nicht voll gewürdigt. Es handelt sich nicht allein um präformierte einfachere Zucker oder um Monosaccharide, die durch Blattenzyme etwa freigelegt werden, sondern auch um Körper wie Pentosane, deren Angreifbarkeit durch Bakterien nicht mehr als zweifelhaft gelten kann. Bei der nicht immer gut beherrschten Technik der Trocknung, die nach den unsicheren Anhaltspunkten der Erfahrung geschieht, kann es vorkommen, daß vorhandene Stärke nicht völlig veratmet wird, sondern als solche oder in Gestalt diastatischer Abbauprodukte im dachreifen Tabak noch erhalten geblieben ist und bei den später eingeleiteten Gärungsprozessen dann ein leicht angreifbares Substrat darstellt. Um uns darüber zu orientieren, ob die einsetzenden Veränderungen überhaupt mit den Vorgängen der bekannten, fermentativ oder durch Organismen erzielten Zuckerspaltungen in eine Beziehung gebracht werden dürfen, haben wir geprüft, ob mit frischen Tabakblättern entsprechende Umwandlungen von Kohlenhydraten erreicht werden können; dabei lassen wir es zunächst ganz dahingestellt, inwieweit in praxi Agenzien des Blattes und der Mikroorganismen zusammenwirken. Nachdem wir festgestellt hatten (s. S. 469 und 470), daß unter den flüchtigen Produkten der frischen Tabakblätter *sowohl Acetaldehyd als Äthylalkohol* als Zeugen einer zymatischen Tätigkeit vorkommen, haben wir das *Abfangverfahren* auf einen Brei von frisch geernteten Tabakblättern angewendet und konstatiert, daß schon innerhalb 24 Stunden ein Prozeß beginnt, der den alkoholischen Gärungen und manchen anderen Zuckerspaltungen vergleichbar ist, da es neben

CO_2-Entwicklung zu einer deutlichen *Anhäufung von Acetaldehyd* kommt. Derselbe kann zwei verschiedene Quellen haben. Eine kann in der in einer Wasserstoffatmosphäre sich stärker dokumentierenden anaeroben Atmung gelegen sein, bei der sich nach Befunden von *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*[1]) Acetaldehyd als Durchgangsglied beim Alkohol liefernden Abbau der Zuckerarten zu erkennen gegeben hat. Zugleich ist aber zu bedenken, daß sogar Hefen als Tabakblätter bewohnende Organismen von *J. Behrens*[2]) nachgewiesen worden sind; solche Gärungserreger können eine zweite Ursache für das Auftreten abfangbaren und über die Brenztraubensäure-stufe erzeugten Acetaldehyds bilden.

Des weiteren haben wir die *saccharifizierenden Fermente* im Tabakblatt studiert. *J. Behrens*[3]) hat sie hier vermißt, doch haben *J. du P. Oosthuizen* und *O. M. Shedd*[4]) mitgeteilt, daß die im gerade geflückten Tabakblatt vorhandenen Enzyme Di- und Polysaccharide zu zersetzen imstande sind. Quantitative Untersuchungen liegen aber, soweit wir sehen, nicht vor. Wir haben festgestellt, daß 100 g eigens zugefügten Rohrzuckers von 200 g Blätterbrei, die 34 g Tabaktrockensubstanz entsprechen, angenähert vollständig hydrolysiert werden. Wir fanden die Tabakblätter auch befähigt, hinzugegebene Stärke anzugreifen, und zwar wurden 20 g hinzugefügter löslicher Stärke wiederum von 34 g Blattsubstanz innerhalb dreier Tage so weit abgebaut, daß die Reduktion nicht mehr zunahm, während die Jodreaktion vollkommen verschwunden war. Es scheint, daß unter den von uns gewählten Verhältnissen die Zerlegung nicht bis zu reiner Glucose fortgeschritten, sondern auf einer früheren Zwischenstufe wenigstens teilweise stehen geblieben war.

Zu den Agenzien, denen man für den Abbau der Monosaccharide eine Bedeutung beimißt, gehören die *Hexose-di-phosphatase* und die *Ketonaldehydmutase*. Beide Enzyme haben wir im Tabakblatt nachzuweisen vermocht. Das Zymo-di-phosphat spaltende Ferment war in 200 g desselben Blätterbreis in solcher Stärke vorhanden, daß es 5 g des Substrats in 0,5 proz. Lösung binnen zweier Tage zu nahezu 100 Proz. zerlegte. Die Ketonaldehydmutase befanden wir wirksam sowohl gegenüber dem Methylglyoxal als dem Phenylglyoxal.

Anhangsweise wollen wir erwähnen, daß auch im *ungekeimten Tabaksamen* Phosphatase wie Ketonaldehydmutase zugegen sind.

---

[1]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **151**, 167, 1924; **160**, 256, 1925.

[2]) *J. Behrens*, Landw. Versuchsst. **45**, 441, 1895.

[3]) *J. Behrens*, Chem. Centralbl. **1894**, I, 430.

[4]) *J. du P. Oosthuizen* und *O. M. Shedd*, Journ. Amer. Chem. Soc. **35**, 1289, 1913; vgl. auch die Angaben von *F. Traetta Mosca* (Chem. Centralbl. **1914**. I. 271) über ein Vorkommen dieser Fermente neben Oxydasen, Peroxydasen, Katalasen *(O. Löw)* und Proteasen.

Unter den vielen Problemen der Tabak-biochemie bietet die genaue Verfolgung der Verhältnisse, die bei den Kohlenhydraten und den ihnen nahestehenden Säuren obwalten, ein Kapitel, das eine eingehende Erforschung verdient, und wir hoffen, hierüber später neue Mitteilungen machen, insbesondere auch Weiteres über die Trennung von enzymatischen und bakteriellen Kohlenhydratspaltungen angeben zu können.

Praktischer Teil.

Zur Erläuterung der voranstehenden Ausführungen und zum Beleg der Schlußfolgerungen lassen wir aus der sehr großen Zahl von vorgenommenen analytischen Bestimmungen nunmehr die hauptsächlichsten Daten, zum Teil in Tabellenform, folgen:

Der Direktion der *Uckermärkischen Tabakverwertungs-Genossenschaft* zu Schwedt a. d. O., sowie Herrn *Heinrich Landfried* von der Firma P. J. Landfried in Heidelberg sagen wir für die Überlassung von Tabak unseren besten Dank.

I. Frischer Tabak.

A. Nachweis präformierter Substanzen.

1. Acetaldehyd.

Frische Tabakblätter (Amersforter aus Schwedt a. d. O.) wurden entrippt und gemahlen. 1 kg dieses saftreichen Breies wurden nach Verdünnung durch 2 Liter Wasser mit Wasserdampf in der für Aldehyddestillationen üblichen Apparatur destilliert. Unter guter Kühlung wurden 3 Liter Destillat aufgefangen und durch anreichernde Destillation in bekannter Weise konzentriert. Gegen Ende wurde eine Rektifikation mit etwas verdünnter Schwefelsäure und eine über Tierkohle eingeschaltet. In dem schließlich 100 ccm betragenden klaren Destillat wurde der Acetaldehyd quantitativ ermittelt.

α) Qualitativer Nachweis.

Einige Kubikzentimeter des Destillats gaben mit Nitroprussidnatrium plus Piperidin schnell eine deutliche Blaufärbung. Mit Fuchsin-Schwefligsäure trat Rotviolettfärbung ein, die auf Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Schwefelsäure sofort verschwand, ein Zeichen dafür, daß neben Acetaldehyd kein Formaldehyd vorhanden war. Mit p-Nitrophenylhydrazin-acetat konnte Hydrazonausscheidung erzielt werden.

β) Quantitative Bestimmung.

Je 20 ccm Aldehydlösung dienten zur Titration nach *Ripper-v. Fürth.* Danach wurden in 100 ccm Enddestillat, entsprechend 1 kg Blätterbrei oder 173,5 g Trockensubstanz, 0,022 55 g, d. h. 0,130 Prom. Acetaldehyd gefunden.

Der in gleicher Weise ebenfalls mit 1 kg gemahlener Blätter ausgeführte Parallelversuch ergab 0,0198 g = 0,114 Prom. Aldehyd[1]).

---

[1]) Spuren fremder Aldehyde (z. B. des bekannten Blätteraldehyds *α*, *β*-Hexylenaldehyd) werden dabei naturgemäß mitbestimmt.

2. *Äthylalkohol (neben Methylalkohol).*

Der in den grünen Tabakblättern in geringen Mengen präformierte Äthylalkohol wurde in gleicher Weise, wie beim Acetaldehyd angegeben ist, durch Wasserdampfdestillation abgetrieben. Es wurde ebenfalls anreichernd destilliert, jedoch konnte bei dieser Gewinnung von Alkohol die Eiskühlung in Fortfall kommen. Zur Bindung anwesenden Aldehyds, der beim Nachweise des Alkohols später stören würde, war es notwendig, einmal über ein wenig Silberoxyd ($AgNO_3$ + NaOH) zu destillieren.

Die Alkohollösungen wurden bei Anwendung von je 1 kg Blätterbrei (*Amersforter*) von 3 Liter jeweils auf 25 ccm konzentriert; in diesen wurde der Alkohol durch verschiedene Reaktionen nachgewiesen.

Die Jodoformprobe fiel positiv aus, die Prüfung auf Aceton und Acetaldehyd mit Nitroprussidnatrium dagegen negativ. Der exakte Nachweis des Äthylalkohols wurde geführt durch Oxydation mittels Chromsäure zu Acetaldehyd, nachdem dessen Abwesenheit im Alkohol-End-Destillat ja nachgewiesen war.

Je 20 ccm der Alkohollösung blieben mit 1 g Kaliumbichromat, gelöst in 10 ccm Wasser, und 5 ccm verdünnter Schwefelsäure ½ Stunde stehen; dann wurden unter guter Kühlung 20 ccm derart übergetrieben, daß schon die ersten Tropfen in Eiswasser aufgefangen wurden. Das Destillat färbte sich auf Zusatz von Nitroprussidnatrium-Piperidin deutlich dunkelblau. Mit Fuchsin-Schwefligsäure trat nach kurzer Zeit intensive Rotviolettfärbung auf, die nach Zugabe von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure nicht verschwand. Das deutete auf Vorhandensein von Formaldehyd neben Acetaldehyd bzw. von primär *Methylalkohol neben Äthylalkohol.*

Durch quantitative Analysen ergab sich, daß nur geringe Spuren Äthylalkohol neben einer Hauptmenge von Holzgeist, auf dessen Ursprung später eingegangen werden soll, zugegen sind.

Die Alkohollösungen wurden nach drei verschiedenen Methoden quantitativ untersucht. Es wurden bestimmt:

1. das spezifische Gewicht,
2. der Methoxylgehalt nach *Zeisel*,
3. der Methylalkohol nach der kolorimetrischen Methode.

Die zwei ersten Methoden liefern die Summe der beiden in Betracht kommenden Alkohole, die dritte den Methylalkohol allein. Da bei Beziehung des spezifischen Gewichts und der Alkyljodidwerte auf Methylalkohol in praxi dieselbe Zahl erhalten wurde, wie bei der kolorimetrischen, lediglich den Methylalkohol anzeigenden Methode nach *Denigès-v. Fellenberg*, so folgt daraus, daß nur Spuren Äthylalkohol anwesend sein können. Sie sind durch die empfindlichen, vorher angegebenen Reaktionen nachgewiesen.

Das *spezifische Gewicht* ($15^0/4^0$) der je 25 ccm betragenden Alkohollösungen belief sich nach Pyknometerwägungen bei Versuch 1 auf 0,99495 und bei Versuch 2 auf 0,99513, d. h. sie enthielten 2,277 und 2,173 Proz. Methylalkohol. In 25 ccm, herstammend aus 173,5 g Trockensubstanz, waren demnach 0,56925 g und 0,54325 g, das sind in Versuch 1) 3,28 Prom. und Versuch 2) 3,13 Prom. $CH_3 . OH$, berechnet auf Trockensubstanz.

Die *Bestimmungen nach Zeisel* wurden derart ausgeführt, daß 5 ccm einer 0,5- bis 1 proz. Methylalkohollösung (hergeleitet aus der pyknometrischen Ermittlung) mit 15 ccm Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,96 in bekannter Weise zur Reaktion gebracht wurden; das nicht verbrauchte Silbernitrat ist nach *Volhard* zurücktitriert worden. So wurde

in dem oben angegebenen Versuch 3,20 Prom. der Trockensubstanz an Methylalkohol gefunden.

Die *kolorimetrische Methylalkoholbestimmung* beruht auf einer Oxydation des Alkohols zu Aldehyd und Farbbildung des Formaldehyds mit Fuchsin-Schwefligsäure auch in stark schwefelsaurer Lösung, in der Acetaldehyd mit dem Mittel nicht reagiert. Die Analysen wurden nach der Vorschrift von *Th. v. Fellenberg*[1]) und unter Benutzung der von ihm angegebenen Tabellen vorgenommen; sie lieferten ausgezeichnete Resultate.

Im vorliegenden Versuch 1 wurde so 3,15 Prom. $CH_3 . OH$ (berechnet auf Trockensubstanz der frischen Blätter) gefunden.

Die gleichartige Untersuchung frischer, in Dahlem gewachsener Blätter der Sorte Wongkong (China) und Latakia (Türkei) lieferte ebenfalls qualitativ nachweisbare Spuren Äthylalkohols. Die Resultate der quantitativen Alkoholbestimmungen, bezogen auf Trockensubstanz, sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I.

Gehalt an Methylalkohol	Prom. $CH_3 . OH$	
	Wongkong	Latakia
a) Gemäß dem spezifischen Gewicht	2,58	2,39
b) Gemäß der Zeiselbestimmung	2,62	2,29
c) Gemäß der kolorimetrischen Bestimmung .	2,61	—

B. Gärungsvorgänge.

1. Anwendung des Abfangverfahrens.

Die Beteiligung von Gärungsvorgängen, bei denen Acetaldehyd als intermediäres Produkt auftritt, wurde durch Fixierung des Aldehyds mittels *Calciumsulfit*[2]) nach dem Abfangverfahren nachgewiesen.

Ansätze.

a) 500 g frischer Blätterbrei (*Amersforter*, Schwedt a. d. O.).
1000 ccm Wasser,
100 g feuchtes, etwa 60proz. Calciumsulfit.

b) 500 g frischer Blätterbrei gleicher Herkunft,
750 ccm Wasser,
100 g desselben Calciumsulfits.

Beide Ansätze wurden mit Wattebäuschen verschlossen und unter häufigem Umschütteln bei 37° aufbewahrt. Nach 30 Stunden erfolgte die Aufarbeitung, indem unter Zusatz von je 1 Liter Wasser und 20 g feinem Calciumcarbonat mit Wasserdampf destilliert wurde. Unter guter Kühlung wurden 1 ½ Liter Destillat aufgefangen und anreichernd unter entsprechenden Vorsichtsmaßregeln destilliert, wobei eine Rektifikation mit Schwefelsäure und eine mit Tierkohle vorgenommen wurde. Die erste entfernt basische Stoffe, die letztere ölige Beimengungen. In beiden Destillaten war

[1]) *Th. v. Fellenberg*, diese Zeitschr. 85, 69, 1918.

[2]) Bei diesem komplexen Gärungsvorgang hat sich weder Dimedon noch Dinatriumsulfit bewährt. Letzteres begünstigt wegen seiner alkalischen Reaktion das Aufkommen von Fäulnisprozessen.

der Acetaldehyd qualitativ durch die Nitroprussidnatriumprobe und das p-Nitro-phenylhydrazon deutlich nachweisbar. Die quantitative Bestimmung wurde wieder durch die Titration nach *Ripper-v. Fürth* vorgenommen.

In den Ansätzen mit je 500 g frischem Blätterbrei = 86,75 g Trockensubstanz wurden in a) 0,10175 g und in b) 0,0781 g $CH_3 . CHO$ gefunden, d. h. 1,173 Prom. in a) und 0,900 Prom. in b) (berechnet auf Trockensubstanz). Da 0,13 und 0,11 Prom. präformierter Acetaldehyd in der Trockensubstanz derselben frischen Blätter (s. S. 469) nachgewiesen worden sind, ist seine Menge durch den Gärungsprozeß rund neunmal größer geworden.

2. *Hexose-di-phosphatase.*

Die Hexose-di-phosphatase der frischen Tabakblätter wurde durch ihre Einwirkung auf das Natrium- und Magnesiumsalz[1]) der Hexose-di-phosphorsäure nachgewiesen. Zum Vergleich wurden auch Spaltungsversuche mit aufgekochtem Blätterbrei und Substrat sowie mit frischem Brei ohne Substrat angestellt.

Ansätze.

a) 0,72 g hexose-di-phosphorsaures Magnesium (= 0,5 g wasserfreies Salz) und
20 g Blätterbrei
mit Wasser zu 100,
2 ccm Toluol.

b) 0,72 g hexose-di-phosphorsaures Mg,
20 g Blätterbrei, die mit
50 ccm Wasser 1 Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt waren,
mit Wasser zu 100,
2 ccm Toluol.

c) 0,75 g hexose-di-phosphorsaures Natrium = 0,5 g trocken,
20 g Blätterbrei,
mit Wasser zu 100,
2 ccm Toluol.

d) 0,75 g hexose-di-phosphorsaures Natrium, die mit
20 g Blätterbrei plus
50 ccm Wasser 1 Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt waren,
mit Wasser zu 100,
2 ccm Toluol.

e) 20 g Blätterbrei
mit Wasser zu 100,
2 ccm Toluol.

p_H überall 6,8 bis 6,9.

Zur Bestimmung der organisch gebundenen Phosphorsäure wurden zu Beginn, nach 17 und nach 48 Stunden Proben entnommen und zentrifugiert. Je 15 ccm des klaren Saftes wurden zur Fällung des anorganischen Phosphats mit 15 ccm Magnesiamixtur versetzt. Nach einstündigem Stehen wurde filtriert und in 20 ccm des Filtrats, das sind 10 ccm Urlösung, der Gehalt

[1]) *C. Neuberg* und *S. Sabetay*, diese Zeitschr. **161**, 240, 1925.

an organisch gebundener Phosphorsäure ermittelt. Das geschah nach der Methode von *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*[1]), die übrigens von den Autoren schon zur Analyse von Hexose-di-phosphat benutzt war, durch Zerstörung der organischen Substanz mittels Wasserstoffsuperoxyd und Eisennitrat als Katalysator, Fällung der Phosphorsäure als Molybdat und Titration des Komplexsalzes. Die auf diese Weise gefundenen Mengen der jeweils in organischer Bindung vorhandenen Phosphorsäure sind aus der Tabelle II ersichtlich.

Tabelle II.

	mg P_2O_5 in 10 ccm der Ansätze				
	a	b	c	d	e
Anfangsbestimmung . .	17,60	18,19	18,41	20,49	0,72
Nach 17 Stunden . . .	3,12	18,23	2,29	20,30	0,57
„ 48 „ . . .	0,67	18,17	0,70	20,04	0,62

3. *Ketonaldehydmutase.*

a) Einwirkung auf Methylglyoxal.

Ein weiterer enzymatischer Vorgang wurde durch die Dismutation zugesetzten Methylglyoxals zu Milchsäure durch frische Blätter von Corrientes (Argentinien) nachgewiesen. Das zu diesen Versuchen verwendete Methylglyoxal war nach der Vorschrift von *H. O. Fischer* und *C. Taube*[2]) durch Destillation von Dioxyaceton mit Phosphorpentoxyd dargestellt und lag nach zweimaliger Rektifikation vollkommen rein vor.

Ansätze.

a) 200 g Blätterbrei, 10 g Calciumcarbonat, 750 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
1 g Methylglyoxal, gelöst in 50 ccm Wasser,
20 ccm Toluol.

b) 200 g Blätterbrei, 10 g Calciumcarbonat, 800 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
20 „ Toluol.

c) 5 g Calciumcarbonat, 475 g Wasser } mit CO_2 gesättigt,
0,5 g Methylglyoxal, gelöst in 25 ccm Wasser,
10 ccm Toluol.

Die Ansätze wurden in Stöpselflaschen vorgenommen, die paraffiniert und unter häufigem Umschütteln bei 37° digeriert wurden. Das zugefügte Calciumcarbonat dient zur Neutralisation der durch Dismutation ent-

[1]) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 196, 1915; Wasserstoffsuperoxyd haben für solche Analysen dann auch *E. J. Baumann* (Journ. biol. Chem. **59**, 667, 1924) sowie *M. Martland* und *R. Robison* (Bioch. Journ. **20**, 849, 1926) angewendet.

[2]) *H. O. Fischer* und *C. Taube*, Ber. **57**, 1502, 1924; **59**, 857, 1926.

stehenden Säure und Aufrechterhaltung einer konstanten Reaktion. Die Betätigung des Ferments, also der Verbrauch des Methylglyoxals, wurde verfolgt nach der zur Methylglyoxal-analyse empfohlenen Methode[1]) von *C. Neuberg* durch Darstellung seines *p-Nitro-phenylosazons* in von Zeit zu Zeit entnommenen und abzentrifugierten Proben. Nach 6 Tagen war das Methylglyoxal im Hauptversuch vollständig umgesetzt, im Vergleichsversuch c) dagegen unverändert vorhanden. Wir schritten zur Aufarbeitung.

Zur Feststellung eines eventuellen unspezifischen Schwindens von Methylglyoxal wurde Ansatz c) filtriert und zur Darstellung des p-Nitrophenyl-osazons 430 ccm des Filtrats mit 3 g p-Nitro-phenylhydrazin, gelöst in wenig Kubikzentimetern eines Gemisches von 50proz. Essigsäure und Alkohol, 1½ Stunden im siedenden Wasserbade erwärmt. Noch heiß wurde abgesaugt und mit verdünnter Essigsäure und wässerigem Alkohol gewaschen. Ausbeute 1,979 g Methylglyoxal-p-nitro-phenylosazon; berechnet für 430 ccm 2,04 g Osazon, d. h. die Ausbeute betrug 96 Proz. der Theorie. Nur 4 Proz. des angewandten Methylglyoxals sind also nicht fermentativ in Milchsäure übergeführt worden. Dieser Wert steht mit den früheren Ermittelungen von *C. Neuberg* und *G. Gorr*[2]) sowie von *G. Gorr* und *G. Perlmann*[3]) in Übereinstimmung.

In den Versuchen a) und b) wurde die Milchsäure ermittelt. Die Anwesenheit von präformierten Oxysäuren des Tabakblattes macht eine Modifikation nötig, über die gelegentlich berichtet wird. Hier genügt die Erbringung des Beweises, daß Tabakferment das Methylglyoxal quantitativ umwandelt.

β) Einwirkung auf Phenylglyoxal.

Die Einwirkung auf dieses Substrat wurde an Blättern von Corrientes (Argentinien) und Latakia (Türkei) verfolgt. Das benutzte Phenylglyoxalhydrat war nach der Vorschrift von *H. Müller* u. *H. v. Pechmann*[4]) dargestellt und hatte nach wiederholtem Umkristallisieren einen Schmelzpunkt von 85°.

Ansätze mit Blättern von Corrientes.

a) 400 g Blätterbrei, 20 g Calciumcarbonat, 1500 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
2 g Phenylglyoxal, gelöst in 100 ccm Wasser,
20 ccm Toluol.

b) 200 g Blätterbrei, 10 g Calciumcarbonat, 800 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
10 „ Toluol.

c) 5 g Calciumcarbonat, 450 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
0,5 g Phenylglyoxal in 50 ccm Wasser,
5 ccm Toluol.

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **49**, 504, 1913.

[2]) *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **166**, 482, 1925; **171**, 475; **178**, 358, 1926.

[3]) *G. Gorr* und *G. Perlmann*, ebendaselbst **174**, 432, 1926.

[4]) *H. Müller* und *H. v. Pechmann*, B. **22**, 2556, 1889.

Wie bei den Versuchen mit Methylglyoxal wurden auch hier die Ansätze in paraffinierten Stöpselflaschen bei 37° aufbewahrt und vielfach umgeschüttelt. Zu Beginn und dann alle 2 Tage wurden je 10 ccm der Reaktionsgemische zentrifugiert und die Abnahme des Phenylglyoxals an Hand der p-Nitro-phenyl-osazonprobe verfolgt. Nach 6 Tagen war in dem Hauptversuch a) der Ketonaldehyd vollständig verschwunden, während er im Vergleichsversuch c) unverändert erhalten geblieben war.

Die Isolierung der gebildeten Mandelsäure im Ansatz a) wurde folgendermaßen ausgeführt.

Die Flüssigkeit des nun noch 1970 ccm betragenden Ansatzes (ursprünglich 2 Liter) wurde zur Ausfällung eines großen Teiles störender Verunreinigungen mit 200 ccm kolloidalem Eisenhydroxyd versetzt und mit Wasser auf 4 Liter aufgefüllt. Durch Zentrifugieren wurden 3560 ccm klare Lösung gewonnen, die eingedampft, mit Phosphorsäure angesäuert und zur Fällung weiterer Verunreinigungen mit Aceton auf 500 ccm ergänzt wurde. Die nach Filtration erhaltenen 445 ccm Lösung wurden völlig eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit Tierkohle gekocht. Da nach dem Einengen der nunmehr hellgelb gefärbten Flüssigkeit noch keine Kristallisation eintrat, wurde wieder in Wasser gelöst und nochmals mit Äther extrahiert. Erhalten = 0,9202 g Mandelsäure. Da theoretisch in der aufgearbeiteten Portion 1,556 g Mandelsäure sein müßten, betrug die Ausbeute 59 Proz. (Der Verlust dürfte durch Adsorption an dem massenhaften Eisenhydroxyd-Niederschlag mitverschuldet sein.) Nach einmaliger Umkristallisation aus Wasser und dreimaliger aus Benzol war die Drehung einer 2,4proz. Lösung — 3,38° im 1-dcm-Rohr, $[\alpha]_D = -140{,}8^\circ$. Nach vier nochmaligen Umkristallisationen aus Benzol betrug $[\alpha]_D = -147{,}8^\circ$ ($c = 2{,}49$, $l = 1$ und $\alpha = -3{,}68^\circ$). Dieses Präparat schmolz bei 127 bis 128°.

Ansätze mit Blättern von Latakia.

Die Zusammenstellung der Ansätze geschah so, wie vorher bei den Versuchen mit Corrientes-Material (s. S. 474) beschrieben ist. Die Dismutation war hier erst nach 9 Tagen beendet. Die Aufarbeitung des Hauptversuchs zur Isolierung der Mandelsäure wurde wegen der Gegenwart vieler ätherlöslicher Verunreinigungen in diesem Falle etwas abgeändert. Zunächst wurden, genau wie zuvor, 1970 ccm des ursprünglich 2 Liter betragenden Gemisches mit 200 ccm kolloidalem Eisen versetzt und auf 4 Liter aufgefüllt. Nach Zentrifugieren und Filtrieren wurden 3450 ccm erhalten, die eingedampft und mit Phosphorsäure angesäuert wurden. Die so auf 190 ccm konzentrierte Mischung wurde filtriert und 171 ccm klares Filtrat erzielt. Nun wurde zur Entfernung eines großen Teiles ätherlöslicher Verunreinigungen zunächst mit Lauge übersättigt und ausgeäthert, dann wieder mit Phosphorsäure angesäuert und nunmehr die Mandelsäure erschöpfend mit Äther extrahiert. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser unter Zugabe von Tierkohle betrug die Ausbeute 0,8845 g. In dem aufgearbeiteten Anteil wären 1,529 g zu erwarten gewesen; d. h. es wurden 57,8 Proz. der Theorie gefunden. Nach erneuter Umkristallisation aus Wasser und einmaligem Umlösen aus Benzol war die Drehung einer 2,49proz. Lösung im 1-dcm-Rohr — 2,10°, d. h. $[\alpha]_D = -84{,}4^\circ$. Nach einer zweiten Umkristallisation aus Benzol betrug $[\alpha]_D = -100{,}8^\circ$ ($c = 2{,}4$, $l = 1$ und $\alpha = -2{,}42^\circ$); der Schmelzpunkt lag bei 120 bis 122°.

C. Nachweis von saccharifizierenden Fermenten.

1. Invertase.

Die starke Fähigkeit, Rohrzucker zu spalten, wurde an zwei verschiedenen Arten frischen, selbstgezogenen Tabaks nachgewiesen, und zwar an den ungestielten Blättern von Corrientes (Argentinien) und den gestielten von Nicotiana rustica (aus ostpreußischem Samen).

Um sicher zu sein, daß wirklich eine fermentative Inversion vorlag, wurden stets drei Versuche:

a) Zuckerlösung plus Ferment,
b) Zuckerlösung plus aufgekochtem Ferment,
c) Ferment plus Wasser

nebeneinander angestellt; zur Verhinderung von Bakterienwachstum wurden 2 Proz. Toluol hinzugefügt. In Zeitabständen, die aus den nachfolgenden Tabellen ersichtlich sind, wurden Proben entnommen und polarimetrisch sowie titrimetrisch untersucht.

a) Ansätze mit Corrientes-Blättern.

a) 200 g Blätterbrei (etwa 34 g Trockensubstanz),
1000 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung,
20 „ Toluol.

b) 200 g Blätterbrei plus
500 ccm Wasser, eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt,
500 „ 20proz. Zuckerlösung,
20 „ Toluol.

c) 200 g Blätterbrei,
1000 ccm Wasser,
20 „ Toluol.

Diese Ansätze wurden bei 37° belassen. p_H war überall und während der ganzen Versuchsdauer 6,8 bis 6,9.

Polarimetrische Messungen.

Zu Beginn und zu den in der Tabelle angegebenen Zeiten wurden je 50 ccm der drei Ansätze abzentrifugiert. Je 10 ccm des klar filtrierten Zentrifugats wurden dann in einem 20 ccm fassenden Maßkölbchen mit 2 ccm kolloidalem Eisen versetzt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Nach Filtration wurden die nunmehr hellgelb gefärbten Lösungen im Saccharimeter, das für ein 2-dm-Rohr Prozente Traubenzucker anzeigt, polarisiert.

Tabelle III.

	Proz. Glucose		
	a	b	c
Anfangsbestimmung	+ 5,30	+ 5,70	0
Nach 1 Tag	+ 2,50	+ 5,70	0
„ 2 Tagen	— 0,40	+ 5,70	0
„ 3 „	— 1,50	+ 5,75	0
„ 4 „	— 1,50	+ 5,70	0
„ 6 „	— 1,55	+ 5,70	0

Zuckertitrationen nach Hagedorn-Jensen.

Die Titrationen wurden zu denselben Zeiten vorgenommen wie die polarimetrischen Bestimmungen. Zur Enteiweißung und Klärung wurden je 1 ccm des klar filtrierten Zentrifugats (s. polarimetrische Messung) mit 25 ccm 0,45proz. Zinksulfatlösung und 5 ccm n/10 Natronlauge versetzt. Nach gutem Umschütteln wurde 3 Minuten lang im siedenden Wasserbad erwärmt, sofort in Eis gestellt und dann durch ein trockenes Filter filtriert. Aliquote Teile dieses Filtrats (31 ccm enthalten 1 ccm Urlösung) wurden zur Mikrotitration nach *Hagedorn-Jensen* benutzt. Aus den durch die Titration gefundenen Mengen reduzierenden Zuckers ergaben sich die Prozentwerte der nachfolgenden Tabelle IV.

Tabelle IV.

	Berechnung als Proz. Traubenzucker		
	a	b	c
Anfangsbestimmung	0,17	0,14	0,10
Nach 1 Tag	3,48	0,16	0,14
„ 2 Tagen	7,50	0,18	0,15
„ 3 „	8,49	0,18	0,17
„ 4 „	8,40	—	—
„ 6 „	8,55	—	0,16

b) Ansätze mit Nicotiana rustica.

a) 80 g Blätterbrei (= etwa 10 g Trockensubstanz),
400 ccm Wasser,
45 g Rohrzucker,
8 ccm Toluol.

b) 80 g Blätterbrei mit
400 ccm Wasser 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt,
45 g Rohrzucker,
8 ccm Toluol.

c) 80 g Blätterbrei,
400 ccm Wasser,
8 „ Toluol.

Die Ansätze blieben ebenfalls bei 37° stehen. p_H war überall 6,8 bis 6,9.

Zuckerbestimmungen mit Fehlingscher Mischung.

Mit diesem Ansatz wurde nur eine Anfangs- und nach 3 Tagen eine End-Zuckertitration vorgenommen. Je 100 ccm der Gemische wurden mit 20 ccm kolloidalen Eisens gut gemischt, filtriert und aliquote Teile davon zur Titration mit *Fehling*scher Lösung nach *Lehmann* verwendet. Daraus ergaben sich die in der Tabelle V zusammengestellten prozentualen Gehalte an reduzierendem Zucker.

Tabelle V.

	Berechnung als Proz. Traubenzucker		
	a	b	c
Anfangsbestimmung	0,12	0,11	0,08
Nach 3 Tagen	10,07	0,47	0,15

2. *Amylase.*

Die Fähigkeit der Tabakblätter, auch zugesetzte Stärke in kurzer Zeit zu hydrolysieren, wurde an Hand von Zuckertitrationen ebenfalls bei den Sorten Corrientes und Nicotiana rustica quantitativ verfolgt. Aus dem Verschwinden der Jodreaktion ging hervor, daß die gesamte Stärke angegriffen wurde, jedoch zeigten die nach den Titrationen berechneten Zuckerwerte, daß diese Hydrolyse nicht quantitativ bis zum Endspaltungsprodukt Glucose fortgeschritten war. Die Ausführung der Versuche geschah analog der vorher bei der Invertase beschriebenen.

α) Ansätze mit Corrientes-Material.

a) 200 g Blätterbrei,
1000 ccm 2proz. Stärkelösung,
20 „ Toluol.

b) 200 g Blätterbrei mit
500 ccm Wasser 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt,
500 „ 4proz. Stärkelösung,
20 „ Toluol.

c) 200 g Blätterbrei,
1000 ccm Wasser,
20 „ Toluol.

Versuchstemperatur 37°, p_H = 6,8 bis 6,9. Die Enteiweißung und Zuckertitration nach *Hagedorn-Jensen* erfolgte so, wie vorher bei den Invertaseversuchen angegeben ist. Die Resultate gibt Tabelle VI wieder.

Tabelle VI.

	Berechnung in Proz. Glucose		
	a	b	c
Anfangsbestimmung	0,222	0,171	0,114
Nach 1 Tag	0,963	0,198	0,150
„ 2 Tagen	0,930	0,195	0,153
„ 3 „	1,176	0,195	0,162
„ 4 „	1,170	—	—

β) Ansätze mit Nicotiana rustica.

a) 80 g Blätterbrei,
200 ccm Wasser,
200 „ 4proz. Stärkelösung,
8 „ Toluol.

b) 20 g Blätterbrei mit
200 ccm Wasser 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt,
200 „ 4proz. Stärkelösung,
8 „ Toluol.

c) 80 g Blätterbrei,
400 ccm Wasser,
8 „ Toluol.

Versuchstemperatur 37°. p_H = 6,8 bis 6,9. Klärung und dann Zuckertitration nach *Lehmann*, wie vorher S. 477 angeführt ist.

Tabelle VII.

	Proz. Glucose		
	a	b	c
Anfangsbestimmung	0,11	0,10	0,08
Nach 3 Tagen	0,95	0,17	0,14

D. Nachweis von Furfurol, Kohlendioxyd und Methylalkohol liefernden Bestandteilen in Tabak.

Furfurol und Kohlensäure wurden in *Amersforter Tabak* (Schwedt a. d. O.), und zwar sowohl im Gesamtblätterbrei, als auch in dem in Wasser von 50° löslichen und unlöslichen Anteil bestimmt, Methylalkohol außerdem noch in nachfolgenden, von uns angebauten Sorten:

Wongkong (China), *Corrientes* (Argentinien), *Maryland* (Nordamerika), *Latakia* (Türkei), *Nicotiana rustica* (Ostpreußen).

Um einen guten Mittelwert zu erzielen, wurden von frisch geerntetem Amersforter Tabak 6 kg entrippter Blätter zu einem homogenen Brei gemahlen und 5 kg davon zur Gewinnung des Wasserauszuges benutzt, der auf folgende Weise dargestellt wurde:

5 kg Brei wurden mit 25 Liter Leitungswasser von 50° 2 Stunden unter öfterem Umrühren stehengelassen. Dann wurde die Gesamtmenge, die ein Volumen von 28,9 Liter hatte, zentrifugiert, danach wurden 24,48 Liter Saft und 4,07 kg Rückstand erhalten. Dieser Rückstand wurde nochmals mit 12 Liter Wasser von 50° über Nacht digeriert; dieses Gemisch, das ein Volumen von 15,4 Liter einnahm, lieferte durch Abschleudern 12,1 Liter Saft und 3,57 kg Rückstand. Es wurden also aus 5 kg Gesamtbrei durch die zweimalige Extraktion 36,58 Liter Auszug und 3,57 kg Rückstand gewonnen. Da der Saft noch einige feste Bestandteile enthielt, wurde er filtriert; 29,77 Liter = 81,38 Proz. der ganzen Menge wurden auf dem Wasserbad auf ein Volumen von 4,4 Liter eingedampft. Das Ausgangsmaterial von 5 kg war damit aufgeteilt in 5,41 Liter eingeengten Saft und 3,57 kg wasserunlöslichen Rückstand.

1. Furfurol.

Die Furfurolbestimmung wurde nach *Tollens*[1]) durch Destillation mit verdünnter Salzsäure und Fällung des Destillats mit Phloroglucin vorgenommen. Die Ergebnisse der Analysen gehen aus Tabelle VIII hervor.

---

[1]) Über die Ausführung s. bei *C. Neuberg*, Der Harn, S. 378.

Tabelle VIII.

Furfurol aus Amersforter Tabak.

Substanz	Einwage der feuchten Substanz	Trockengewicht des Ausgangsmaterials in Proz.	Furfurol g	Furfurol in Proz. der Trockensubstanz
Gesamtbrei	10,38 g	17,35	0.0822	4,56
„	10.94 g	17,35	0,0866	4.56
„	10,51 g	17,35	0,0837	4,59
Wasserauszug	100 ccm *) = 102,32 g	6,505	0,0948	1,43
„	102,32 g	6,505	0.0962	1,44
„	102,32 g	6,505	0,0974	1,46
Rückstand des Wasserauszuges	10,94 g	14,0	0.0924	6,03
„ „ „	11.61 g	14,0	0,0997	6,13
„ „ „	11,03 g	14,0	0,0949	6,14

*) 100 ccm enthalten 6,6562 g Trockensubstanz.

2. Kohlensäure.

Das aus Uronsäure des Pektins im Tabak stammende Kohlendioxyd wurde nach *Lefèvre* und *Tollens*[1]) ermittelt. Die Bestimmungen sind in Tabelle IX zusammengefaßt.

Tabelle IX.

Kohlendioxyd aus Amersforter Tabak.

Substanz	Einwage	Gehalt an Trockensubstanz in Proz.	CO_2 g	CO_2 in Proz. der Trockensubstanz
Gesamtbrei	19,05 g	17,35	0.0770	2,33
„	20,75 g	17,35	0.0848	2,35
„	18,22 g	17,35	0,0755	2,39
Wasserauszug	200 ccm = 204,64 g	6,505	0,0871	0,65
„	204,64 g	6,505	0,0850	0,64
Rückstand des Wasserauszuges	20,11 g	14,0	0,0931	3,30
„ „ „	20,08 g	14,0	0,0925	3,29

3. Methylalkohol.

Den Methylalkohol haben wir durch Verseifung der Blattsubstanz mit Natronlauge in Freiheit gesetzt und, wie üblich, durch anreichernde Destillation konzentriert.

Bei Verwendung von Blätterbrei gingen wir folgendermaßen vor:

Je 2 kg des frischen Breies wurden in einem 20 Liter fassenden Kupferkolben im siedenden Wasserbad auf 80 bis 90° erwärmt, darauf mit 1 Liter

---

[1]) l. c.

10proz. Natronlauge versetzt, verschlossen, umgeschüttelt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Morgen wurden 500 ccm Schwefelsäure (1 Volumen konzentrierter Schwefelsäure + 4 Volumen Wasser) zugefügt und mit Wasserdampf 4 Liter abgeblasen. (Das Reaktionsgemisch wurde, um ein Anbrennen zu vermeiden, in einem Kochsalzbade erhitzt.) Durch anreichernde Destillation, bei der stets zwei Drittel der Flüssigkeitsmenge übergetrieben und zum Schluß einmal über Schwefelsäure, einmal mit Silbernitrat-Natronlauge und schließlich mit Tierkohle rektifiziert waren, wurde der Alkohol auf ein bestimmtes Volumen, z. B. 100 ccm, gebracht. Mit dieser Endlösung sind dann die Reaktionen und analytischen Bestimmungen vorgenommen worden.

Die Verarbeitung des *Wasserauszuges* gestaltete sich folgendermaßen:

2,5 Liter Saft wurden heiß mit 200 ccm 33proz. Natronlauge versetzt und nach vollendeter Verseifung unter Zufügung eines kleinen Überschusses von Schwefelsäure (Konzentration wie vorher angegeben) mit Wasserdampf behandelt. Die aufgefangenen 3 Liter Destillat wurden (s. oben und zuvor S. 470) einkonzentriert. Die Untersuchung der schließlich erhaltenen Methylalkohollösungen erstreckte sich stets:

a) auf qualitative Proben zum Nachweis etwa vorhandener Aldehyde oder einer Beimischung von Äthylalkohol;

b) auf quantitative Alkoholbestimmungen.

Diese geschahen:

1. durch Ermittlung des spezifischen Gewichts,
2. nach der Methode von *Zeisel* (Methoxylbestimmung),
3. nach der kolorimetrischen Methylalkoholbestimmungsmethode von *Denigès-v. Fellenberg*.

Aldehyde waren nach der erwähnten Reinigung niemals mehr vorhanden; Äthylalkohol war in allen Proben nur in geringen Spuren[1]) zugegen.

Tabelle X gibt einen Überblick über die Ergebnisse der quantitativen Analysen.

Tabelle X.

Methylalkohol aus frischen selbstgezogenen Tabakblättern.

Substanz	Gehalt an Trockensubstanz Proz.	Methylalkohol in Proz. der Trockensubstanz nach dem spez. Gew.	nach Zeisel-analysen	nach kolorimetrischer Bestimmung
Amersforter Gesamtbrei	17,35	0,695	0,724	—
„ Wasserauszug	6,505	0,1075	—	—
„ Rückstand des Wasserauszuges	14.00	1.148	—	—
Wongkong	16,81	0.599	0,686	0,690
Corrientes	17,13	0.847	0,624	0,712
Maryland	20,97	0.835	0,712	—
Latakia	14,50	—	0,676	0,662
Nicotiana rustica	12,49	1,190	0.784	0,808

[1]) Methode des Nachweises s. S. 470.

Die Übersicht über die Verteilung von abspaltbarem Furfurol, Kohlendioxyd und Methylalkohol auf das Material des Wasserauszuges und des wasserunlöslichen Rückstandes von 5 kg Amersforter Tabak erleichtert die Tabelle XI.

Tabelle XI.

	I. In 5 kg Gesamtbrei g	II. In 3,57 kg Rückstand g	III. In 5,41 Liter wässerigem Auszuge
Furfurol	39,55	30.80	5.15 g = 13,0 Proz von I
Kohlendioxyd . .	20,55	16 50	2.36 g = 11,5 „ „ I
Methylalkohol . .	6,27	5,72	0,387 g = 6,2 „ „ I

Die erzielten Werte für Furfurol und Kohlendioxyd möchten wir nur als vorläufige betrachten.

Auf S. 470 wurde beschrieben, daß schon die unmittelbare Destillation frischer Tabakblätter mit Wasserdampf Methylalkohol liefert. Der Übersicht wegen sind die festgestellten Zahlen in Tabelle XII zusammengefaßt.

Tabelle XII.

Durch direkte Destillation abspaltbarer Methylalkohol in Prozenten der Trockensubstanz.

Material	Gehalt an Trockensubstanz	Nach dem spezifischen Gewicht	Nach Zeiselanalyse	Nach kolorimetrischer Bestimmung
Amersforter	17.35	0.328	0.320	0.315
Wongkong	16.80	0.258	0.262	0.261
Latakia	14 50	0.239	0,229	—

Rund 35 bis 45 Proz. des gesamten Methylalkohols wurden also bereits durch bloße Wasserdampfdestillation, d. h. ohne besondere Verseifung, erhalten. Auch dieser Holzgeist stammt wohl sicherlich aus Pektin; ein Vergleichsversuch mit isoliertem Rohpektin aus Zuckerrüben hat nämlich ergeben, daß etwa 25 Proz. der nach Methoxylbestimmungen vorhandenen Menge gebundenen Methylalkohols allein durch eine Destillation mit Wasserdampf frei wurden.

II. Getrockneter Tabak.

Die *Untersuchungen an selbstgetrocknetem Tabak* (Luft-trocknung) beziehen sich in erster Linie auf die Ermittelung von Furfurol, Kohlensäure und Methylalkohol bei Amersforter Tabak. Die analytischen Methoden waren die vorher angeführten. Auch der getrocknete Tabak wurde entrippt und fein zermahlen.

Tabelle XIII gibt die Analysenresultate der Furfurol- und Kohlensäurebestimmungen an.

Tabelle XIII.

Furfurol.

	Einwage g	Gehalt an Trockensubstanz in Proz.	Furfurol g	Furfurol in Proz. der Trockensubstanz
α	1,8399	92,75	0,0971	5,69
β	1,5786	92,75	0,0847	5,87

Kohlendioxyd.

	Einwage g	Gehalt an Trockensubstanz in Proz.	CO_2 g	CO_2 in Proz. der Trockensubstanz
α	5,0330	92,75	0,1605	3,44
β	5,0318	92,75	0,1621	3,47

Methylalkohol.

Der aus selbstgetrocknetem Amersforter Tabak erhältliche Methylalkohol wurde bestimmt:

1. nach Verseifung;
2. nach einfacher Einwirkung von Wasserdampf;
3. nach Verseifung der im Wasser löslichen Anteile des trockenen Tabaks;
4. nach Verseifung des in Wasser unlöslichen Rückstandes.

Die Auslaugung des getrockneten Tabaks mit Wasser geschah in der Weise, daß 150 g zerkleinerte Blätter mit 3 Liter Wasser von Zimmertemperatur verrührt, 2 Stunden stehengelassen, abgepreßt und nachgewaschen wurden.

Tabelle XIV.

Methylalkoholgehalt, berechnet auf Trockensubstanz.

	Nach pyknometrischer Bestimmung Proz.	Nach Methoxylbestimmung Proz.
1. Nach Verseifung	0,925	0,931
2. Durch direkte Wasserdampfdestillation	0,360	0,354
3. Im Wasserauszuge des Tabaks	0,238 *)	0,242 *)
4. Im festen Rückstande	0,608 **)	0,638 **)

*) Diese Zahlen geben den Gehalt an Methylalkohol in dem Material an, das aus 100 g Trockensubstanz getrockneten Tabaks durch Extraktion mit Wasser in Lösung geht.

**) Methylalkoholgehalt des wasserunlöslichen Rückstandes von 100 g extrahiertem, getrocknetem Tabak.

Eine Berechnung nach den Daten der Methoxyl-Bestimmungen lehrt, daß $\frac{354}{931} \cdot 100 = 38$ Proz. des Methylalkohols durch bloße Wasserdampfdestillation abgespalten waren. Der nach Auslaugung mit Wasser und darauf folgender Verseifung erhaltene Methylalkohol machte $\frac{242 . 100}{242 + 638} = 27{,}5$ Proz. des aus den getrockneten Blättern erhältlichen Gesamt-methylalkohols aus.

III. Gebrauchsfertiger Tabak.

1. Dunkelfarbige Tabake.

α) Furfurol und Kohlendioxyd.

Abspaltbares Furfurol und Kohlendioxyd wurden in einem exotischen Tabak, St. Felix, und einem deutschen Erzeugnis, Hockenheimer Tabak, in der geschilderten Weise ermittelt. Die gewonnenen Daten gibt die Tabelle XV an.

Tabelle XV.

Furfurol.

Tabaksorten	Einwage g	Gehalt an Trockensubstanz in Proz.	Furfurol g	Furfurol in Proz. der Trockensubstanz
St. Felix	1,4527	89,30	0 0643	4,96
„ „	1,7051	89,30	0.0775	5,09
Hockenheimer . .	1,7426	92,08	0,0795	4,95*)
„ . .	1,6969	92,08	0,0754	5,09

*) Die Übereinstimmung der Furfurolwerte für beide Sorten ist natürlich Zufall.

Kohlendioxyd.

Tabaksorten	Einwage g	Gehalt an Trockensubstanz in Proz.	CO_2 g	CO_2 in Proz. der Trockensubstanz
St. Felix	5,0546	89,30	0,1490	3.30
„ „	5,0294	89,30	0,1460	3,25
Hockenheimer . .	5.0250	87,85	0,1313	2,97
„ . .	5,0105	87,85	0,1298	2,95

β) Methylalkohol.

Der aus vergorenen Tabaken erhältliche Methylalkohol wurde in der vorher beschriebenen Weise nach Verseifung mit Natronlauge bestimmt.

Zu den Untersuchungen wurde als deutscher Tabak Hockenheimer, Ernte 1925, und das Material folgender 12 exotischen Sorten benutzt: Sumatra I, II, Java, Bezocki-Java, Java-Kuba, Domingo I, II, Maryland, Kentucky, Brasil, St. Felix, Trapezunt.

Die nach den drei verschiedenen Methoden gefundenen Methylalkoholwerte sind aus Tabelle XVI ersichtlich.

Tabelle XVI.

Nr.	Tabaksorten	Gehalt an Trockensubstanz Proz.	Proz. Methylalkohol, berechnet auf Trockensubstanz		
			nach pyknometrischer Bestimmung	nach Methoxylbestimmung	nach kolorimetrischer Bestimmung
1	Sumatra I	87,60	0,062	0,042	0,042
1a	„ I	87,60	0,041	—	—
2	„ II	87,62	0,069	0,044	—
2a	„ II	87,62	0,065	—	—
3	Java	89,75	0,127	0,135	0,140
3a	„	89,75	0,121	—	—
4	Bezocki-Java	89,40	0,071	0,107	—
4a	„ „	89,40	0,072	—	—
5	Java-Kuba	91,90	0,122	0,093	0,094
5a	„ „	91,90	0,121	—	—
6	Domingo I	84,25	0,029	0,032	—
6a	„ I	84,25	0,018	—	—
7	„ II	88,30	0,040	0,048	0,050
7a	„ II	88,30	0,031	—	—
8	Maryland *)	90,05	0,242	0,256	—
8a	„	90,05	0,239	—	—
9	Kentucky	89,50	0,133	0,135	0,138
9a	„	89,50	0,121	—	—
10	Brasil	88,20	0,070	0,052	—
10a	„	88,20	0,069	—	—
11	St. Felix	89,30	0,054	0,057	0,057
11a	„	89,30	0,054	—	—
12	Trapezunt	88,60	0,136	0,142	—
12a	„	88,60	0,126	—	—
13	Hockenheimer	91,65	0,156	0,174	0,174
13a	„	91,65	0,150	0,154	—

*) In der Farbe sich den hellen Sorten (s. Tabelle XVII) nähernd.

2. Hellfarbige Rauchtabake.

Sechs helle Tabake: Smyrna Caloup, Cavalla Maxoul, Tachova, Argos, China, Virginia wurden auf ihren Methylalkoholgehalt hin untersucht.

Tabelle XVII.

Nr.	Tabaksorte	Gehalt an Trockensubstanz Proz.	Methylalkohol (nach Verseifung) in Proz. der Trockensubstanz		
			nach dem spezifischen Gewicht	nach Methoxylanalyse	nach kolorimetr. Bestimmung
1	Smyrna	91,90	0,658	0,662	0,673
1a	„	91,90	0,642	—	—
2	Cavalla	92,50	0,467	0,467	0,473
2a	„	92,50	0,460	—	—
3	Tachova	91,00	0,631	0,594	—
3a	„	91,00	0,626	—	—
4	Argos	89,51	0,574	0,537	0,563
4a	„	89,51	0,522	—	—
5	China	94,41	0,834	0,678	0,709
5a	„	94,41	0,750	—	—
6	Virginia	90,10	0,684	0,674	—
6a	„	90,10	0,670	—	0,670

Tabelle XVII gibt die nach Verseifung, Tabelle XVIII die durch direkte Wasserdampfdestillation gewonnenen Holzgeistmengen an.

Tabelle XVIII.

Nr.	Tabaksorte	Gehalt an Trockensubstanz Proz.	Methylalkohol (ohne Verseifung) in Proz. der Trockensubstanz	
			nach dem spezifischen Gewicht	durch Analyse nach *Zeisel*
1	Smyrna	91,90	0,159	0,152
2	Argos	90,15	0,168	0,140

Auch beim fertigen Tabak wurde also, wie wir es für frischen und getrockneten Tabak schon angeführt haben (s. S. 470 u. 483), etwa ein Viertel des Gesamtalkohols durch bloße Behandlung mit Wasserdampf abgespalten.

Zu sämtlichen Methylalkoholzahlen möchten wir bemerken, daß im allgemeinen die Bestimmung aus dem spezifischen Gewicht von geringerer Genauigkeit ist, da mit dem Holzgeist neutrale ölige Bestandteile sich verflüchtigen; durch Knochenkohle werden sie zwar größtenteils absorbiert, kleine Mengen bleiben aber im Methylalkohol gelöst (vgl. auch den folgenden Abschnitt).

Darstellung des Methylalkohols in Substanz.

Die durch 30 Einzelversuche erhaltenen verdünnten methylalkoholischen Lösungen wurden vereinigt, anreichernd auf 50 ccm konzentriert und mit Kaliumcarbonat übersättigt. Dabei schieden sich 10 ccm Methylalkohol ab. Sie wurden abgehoben, durch Filtration von Spuren festen Kaliumcarbonats befreit und mit Calciumspänen[1]) entwässert. Eine gute Trocknung wurde durch achtstündiges Erhitzen der mit frischen Spänen versetzten Lösung auf etwa 60° erreicht. Dann wurde der Alkohol überdestilliert, wobei als geringer Rückstand ein dunkel gefärbtes hochsiedendes Öl zurückblieb. Eine zweite Rektifikation ebenfalls über metallischem Calcium lieferte völlig reinen, wasserfreien Methylalkohol vom Siedepunkt 65°.

Anhang:

Tabaksamen.

1. *Phosphatase.*

a) Spaltung von mono-phenyl-ortho-phosphorsaurem Kalium[2]).

Ansätze.

a) 200 ccm ½proz. Lösung von mono-phenyl-ortho-phosphorsaurem Kalium,
20 g fein gemahlener Samen,
2 g Calciumcarbonat,
4 ccm Toluol.

---

[1]) Vorschrift von *J. Gyr*, Ber. 41, 4322, 1908.

[2]) Über dieses jüngst als spaltbar erkannte Substrat siehe bei *C. Neuberg* und *J. Wagner*, diese Zeitschr. 171, 485, 1926 sowie bei *R. Iwatsuru*, ebendaselbst 178, 348, 1926.

b) 200 ccm Wasser,
20 g Samenpulver,
2 g Calciumcarbonat,
4 ccm Toluol.

c) 200 ccm ½ proz. Lösung des Di-kalium-phenol-phosphats,
2 g Calciumcarbonat,
4 ccm Toluol.

Die Wirkung der Phosphatase wurde an Hand von Phenolbestimmungen [letztere nach *Koßler-Penny-Neuberg*[1])] an Proben ermittelt, die in Abständen entnommen und unter Zusatz von Calciumcarbonat destilliert wurden.

Tabelle XIX.

	g Phenol aus 50 ccm Reaktionsgemisch			Spaltung *) in Proz.		
	a	b	c	a	b	c
Anfangsbestimmungen . .	0	0	0	0	0	0
Nach 2 Tagen	0,01567	—	—	16,6	—	—
„ 4 „	0,01724	0	0	18,3	0	0

*) 0,25 g wasserfreies $(C_6H_5)K_2PO_4$ können 0,0940 g Phenol liefern.

β) Spaltung von hexose-di-phosphorsaurem Magnesium.

Die Betätigung der Hexose-di-phosphatase wurde an einem Fermentsaft studiert, der auf nachstehende Weise gewonnen worden war.

20 g fein gemahlener Tabaksamen wurden in 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, 5 Stunden bei 37°, weitere 14 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann zentrifugiert. Es wurden 160 ccm klarer Saft erzielt.

Ansätze.

a) 70 ccm Saft,
1 g Magnesiumsalz = 0,7 g $C_6H_{10}O_4(PO_4Mg)_2$,
1,4 ccm Toluol.

b) 70 ccm Wasser,
1 g Magnesium-zymo-di-phosphat,
1,4 ccm Toluol.

c) 70 ccm Saft,
1,4 ccm Toluol.

Zu den aus Tabelle XX ersichtlichen Zeiten wurden den Reaktionsgemischen je 10 ccm entnommen, mit 10 ccm Wasser und mit 10 ccm Magnesiamixtur versetzt. Nach einstündigem Stehen wurde filtriert und in 15 ccm des klaren Filtrats (entsprechend 5 ccm des Urgemisches) noch esterförmig vorhandene Phosphorsäure bestimmt. Nach Zerstörung der organischen Substanz, die hier durch Soda-Salpeter-Schmelze und Abrauchen mit konzentrierter Salpetersäure erfolgt war, wurde das Phosphat über das Molybdat schließlich mit Magnesiamixtur gefällt und als $Mg_2P_2O_7$ zur Wägung gebracht (s. Tabelle XX).

[1]) Über die Ausführung siehe bei *C. Neuberg*, Der Harn, S. 476.

Tabelle XX.

	mg $Mg_2P_2O_7$		
	a	b	c
Anfangsbestimmungen	28,8	27,7	6,0
Nach 6 Stunden	11,5	27,8	3,3
„ 1 Tag	10,0	27,8	0,7
„ 2 Tagen	8,1	27,7	0,0
„ 3 „	5,3	—	0,9
„ 5 „	4,6	27,9	0,2

Die Werte der Kolumne c tun dar, daß eine im Tabaksamen natürlicherweise vorkommende wasserlösliche organische Phosphorsäure-verbindung enzymatisch zerfällt.

2. *Ketonaldehydmutase.*

Ansätze.

a) 75 g fein gemahlener Tabaksamen, 15 g Calciumcarbonat, 1350 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
1,5 g Phenylglyoxal in 150 ccm Wasser,
15 ccm Toluol.

b) 25 g Tabaksamenmehl, 5 g Calciumcarbonat, 500 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
5 „ Toluol.

c) 5 g Calciumcarbonat, 450 ccm Wasser } mit CO_2 gesättigt,
0,5 g Phenylglyoxal in 500 ccm Wasser,
5 ccm Toluol.

Jeder dieser Ansätze wurde, wie bei den entsprechenden Versuchen mit Blätterbrei vorher (S. 473) beschrieben worden ist, in paraffinierten Stöpselflaschen bei 37° aufbewahrt und die Dismutation an Hand der Osazonbildung mit essigsaurem p-Nitro-phenylhydrazin verfolgt. In Versuch a) fiel nach 8 Tagen die Osazonprobe negativ aus, während in Kontrollansatz c) kein Verschwinden des Phenylglyoxals beobachtet worden war. Die Aufarbeitung geschah, wie auf S. 475 angegeben ist. Wegen des hohen Fettgehalts der Samen gelang es zunächst nicht, die Mandelsäure kristallisiert zu gewinnen. Aus Ansatz a) wurde eine Substanz erhalten, die nach aufeinanderfolgender Überführung in Äther und Wasser sowie nach Äther-Extraktion aus saurer, zuvor alkalisch mit Äther ausgeschüttelter Lösung stark lävogyr war. Diese Linksdrehung ist, da die gleichartige Aufarbeitung von Tabaksamensubstanz in Ansatz b) keine optisch aktive Substanz lieferte, auf lävogyre Mandelsäure zurückzuführen.

Zusammenfassung.

Die Untersuchung verschiedener Sorten frischer, getrockneter und gebrauchsfertiger Tabake hat folgendes ergeben:

1. In frischem Tabak sind außer anderen flüchtigen Substanzen kleine Mengen Acetaldehyd und Äthylalkohol zugegen.

2. Neben diesen Substanzen entweicht bei der Behandlung frischer Tabakblätter mit Wasserdampf auch Methylalkohol. Dieser ist nicht im freien Zustande vorgebildet, sondern wird aus einem Pektinester abgespalten.

3. Die Menge des Acetaldehyds läßt sich erheblich steigern, wenn man einen Brei frischer Tabakblätter mit sekundärem Calciumsulfit digeriert. Bei der einsetzenden regelrechten Vergärung präformierter sowie durch Hydrolyse entstandener einfacher Saccharide wird dann durch das angewendete Abfangmittel Acetaldehyd fixiert. Er kann, wie die gleichzeitig entwickelte Kohlensäure, sowohl von den im Blatte vorhandenen Agenzien der intramolekularen Atmung als von anwesenden Mikroorganismen hervorgebracht werden. (Dinatriumsulfit ist für die Abfangung ungeeignet.)

4. Von Enzymen, die für die Zuckerspaltung in Betracht gezogen werden, ist im frischen Blätterbrei Hexose-di-phosphatase unschwer nachzuweisen. Sie zerlegt unter antiseptischen Bedingungen sowohl das Natrium- als das Magnesium-salz des Zymo-di-phosphates schnell und praktisch quantitativ.

5. Von den Fermenten des Oxydo-Reduktions-Apparates kann Ketonaldehydmutase im Brei frischer Tabakblätter ohne weiteres aufgezeigt werden. Wir sahen sie in Gegenwart von Toluol funktionstüchtig gegenüber dem Methylglyoxal und Phenylglyoxal. Aus letzterem entstand linksdrehende Mandelsäure, die kristallisierte und in einem Falle in nahezu völliger optischer Reinheit gewonnen werden konnte.

6. Die Wirksamkeit der im frischen Tabakbrei enthaltenen Saccharase wurde quantitativ verfolgt. Das Enzym ist in so kräftiger Form vorhanden, daß z. B. 1000 ccm 10proz. Rohrzuckerlösung durch 200 g Blätterbrei, entsprechend 34 g Trockensubstanz, in 24 Stunden nahezu vollständig zerlegt wurden.

7. Für die vorhandene Amylase wurde gezeigt, daß sie unter entsprechenden Verhältnissen 20 g zugesetzte Stärke verzuckerte.

8. Frische Blätter, an der Luft getrockneter sowie gebrauchsfertiger Tabak — sei er wirklich vergoren oder irgendwie gedörrt —, enthalten Furoide. Dieselben kommen im Blatte mindestens teilweise ursprünglich als Pektin vor. Frische, getrocknete sowie vergorene Tabake spalten bei Behandlung mit Salzsäure neben Furfurol auch Kohlendioxyd ab, das aus einer Uronsäure hervorgeht.

9. Aus sämtlichen frischen, getrockneten und vergorenen Tabaken läßt sich durch Verseifung Methylalkohol frei machen.

Im Gehalt an diesem esterartig gebundenen Methylalkohol bestehen charakteristische Unterschiede:

a) In frischen Tabakblättern kommen durchschnittlich 7 bis 9 Prom. Methylalkohol in Esterform gebunden vor.

β) Ein von uns an der Luft getrockneter Tabak besaß 30 Proz. mehr estermäßig gebundenen Methylalkohol, als in dem gleichen frischen Material gefunden war. Diese Zunahme beruht hauptsächlich auf der Verflüchtigung kohlenhydrathaltiger Substanzen durch postmortale Atmung, bei der überwiegend auf aerobem Wege Kohlendioxyd aus Zucker gebildet wird.

γ) Dunkelfarbige deutsche sowie dunkle fremdländische Zigarrentabake wiesen im Mittel nur einen Gehalt von 1 Prom. an esterförmig gebundenem Methylalkohol auf; das ist ein Bruchteil des im frischen, unverarbeiteten Blatte vorhandenen Quantums.

δ) Die hellen Zigaretten- oder Pfeifen-tabake, die allem Anschein nach lediglich getrocknet oder anders als die dunklen Zigarrentabake vergoren werden, besaßen im Durchschnitt einen Gehalt von 5 bis 7 Prom. an gebundenem Holzgeist.

10. Die Bestimmungen des Methylalkohols wurden nach drei verschiedenen Methoden ausgeführt. Der Holzgeist wurde nach vorsichtiger, aber quantitativer Verseifung des im Tabakmaterial enthaltenen Esters übergetrieben und unter zweckmäßiger Reinigung anreichernd destilliert; durch dieses Vorgehen ist eine Abspaltung von Methanol aus anderen Methoxylverbindungen als aus Pektin vermieden.

11. Aus den einkonzentrierten Destillaten verschiedener Tabaksorten wurde der Methylalkohol durch Aussalzung mittels Kaliumcarbonat sowie durch Trocknung und Rektifikation über Calciumspänen in völlig reinem Zustande abgeschieden.

12. In ergänzenden Versuchen mit ungekeimtem Tabaksamen wurde die Anwesenheit von Phosphatasen dargetan, die auf monophenyl-ortho-phosphorsaures Kalium und Zymo-di-phosphat wirkten; auch Ketonaldehydmutase fand sich vor. Dieses alles spricht dafür, daß ein Teil der Kohlenhydratumwandlungen von Agenzien der Tabakpflanze selber besorgt wird.

Autorenverzeichnis.

